

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

ANDA DÓRA

A BUDAI TERMÁLKARSZT VÍZ ÉS BIOFILM PROKARIÓTA KÖZÖSSÉGEINEK
SOKFÉLESÉGE ÖSSZEFÜGGÉSBEN A HIPOGÉN KARSZTOSODÁSSAL

DOKTORI ÉRTEKEZÉS



ELTE BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
ISKOLAVEZETŐ: PROF. DR. ERDEI ANNA

ZOOTAXONÓMIA, ÁLLATÖKOLÓGIA, HIDROBIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM
PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. TÖRÖK JÁNOS

TÉMAVEZETŐK:

DR. BORSODI ANDREA
HABILITÁLT DOCENS

DR. MAKK JUDIT
ADJUNKTUS

BUDAPEST
2019

*„FENN MÁR KIGYÚLT AZ ÉJSZAKA,
ESTI FÉNYEK RAGYOGNAK SZERTESZÉT,
DE A PATAK NEM HOZZA EL NEKÜNK
A CSILLAGOK NESZÉT.
OTT FENN BARÁTOK ALSZANAK,
TALÁN RÁNK GONDOLNAK MÉG,
DE ITT LENN SÖTÉTEK A FALAK,
CSAK A KARBIDLÁMPA ÉG.”*

SEBESTYÉN ISTVÁN (1953-2000)

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék.....	6
2. Bevezetés	7
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1. A kontinentális karsztrendszerek típusai, az epigén és a hipogén karsztosodás folyamata	8
3.2. A Budai-hegység földtani jellemzése	9
3.3. A Budai Termálkarszt hidrogeológiai viszonyai	10
3.3.1. A Rózsadomb és környékének barlangjai és forrásai.....	13
3.3.2. A Gellért-hegy barlangjai és forrásai	14
3.4. Barlangi biofilm közösségek	16
3.4.1. Barlangi biofilmek morfológiai vizsgálata.....	18
3.4.2. Barlangi biofilmek tanulmányozása tenyésztéses és molekuláris klónozási módszerekkel	20
3.4.3. Barlangi mikrobaközösségek vizsgálata új generációs genomszekvenálással...	24
3.5. Mikroorganizmusok részvétele karsztosodási folyamatokban	26
3.6. Hazai termálkarsztos barlangi környezetek mikrobiológiai vizsgálata	29
4. Célkitűzések.....	35
5. Anyagok és módszerek	36
5.1. Mintavételi helyek bemutatása és mintavétel.....	36
5.1.1. Mintavételek a Molnár János-barlangból.....	36
5.1.2. Mintavétel a városligeti VL-II kútból	37
5.1.3. Mintavétel a Gellért Ősforrásból	38
5.1.4. Mintavételek a Diana-Hygieia-forrásbarlangból	39
5.1.5. Mintavételek a Rudas-Török forrásbarlangból	39
5.1.6. Mintavétel a Rác-fürdő Nagy-forrásából	40
5.2. A termálvizek fizikai és kémiai paramétereinek vizsgálata	41
5.3. A minták mikroszkópos vizsgálata.....	41
5.4. Mintaelőkészítés és a közösségi DNS kinyerése	42
5.5. Molekuláris klónozáson alapuló közösségszerkezeti vizsgálatok	43
5.6. Píroszekvenáláson alapuló közösségszerkezeti vizsgálatok.....	46
5.7. Az adatok statisztikai elemzése	49
6. Eredmények	50

6.1.	A BTK forrásvizeinek és a barlangi kőzetek felszínéhez kapcsolódó biofilmeknek a vizsgálata	50
6.1.1.	A BTK forrásvizeinek fizikai és kémiai jellemzői.....	50
6.1.2.	A BTK-ból származó barlangi biofilm minták pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálati eredményei.....	52
6.1.3.	A BTK forrásvizeinek és a barlangi biofilmeknek molekuláris klónozáson alapuló közösségszerkezeti vizsgálati eredményei	56
6.2.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó forrásbarlangok 2014. és 2015. évi mintavételeket követő vizsgálata.....	61
6.2.1.	A Rózsadombhoz tartozó Molnár János-barlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással	61
6.2.2.	A Gellért-hegyhez tartozó Diana-Hygieia-forrásbarlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással	64
6.2.3.	A Gellért-hegyhez tartozó Rudas-Török-forrásbarlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással	66
6.3.	Biofilmképződés tanulmányozása egy <i>in situ</i> modellrendszer segítségével a Rudas-fürdő Török-forrásban	69
6.3.1.	A Rudas-Török-forrásbarlang vízkémiai paramétereinek változása egy <i>in situ</i> kísérlet folyamán.....	69
6.3.2.	A Rudas-Török-forrásbarlangban egy <i>in situ</i> modellrendszerben kialakult biofilm elektronmikroszkópos vizsgálatának eredményei.....	70
6.3.3.	A Rudas-Török-forrásbarlangban egy <i>in situ</i> modellrendszerben képződött biofilm baktériumközösségeinek fajszámbecslő és diverzitás indexei	77
6.3.4.	A Rudas-Török-forrásbarlangban egy <i>in situ</i> modellrendszerben fejlődött biofilm amplikonszekvenáláson alapuló vizsgálatának eredményei	79
6.4.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz-, biofilm-, kalcit- és üledék baktériumközösségeinek részletes összehasonlító elemzése.....	84
7.	Eredmények értékelése	88
7.1.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz és biofilm prokarióta közösségeinek összetétele a 2012-es mintavétel során	88
7.1.1.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó vizek környezeti paraméterei	88
7.1.2.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok mikrobaközösségeinek diverzitása.....	89
7.2.	A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok vizére és egyes kiválás típusaira jellemző baktériumközösségek diverzitása amplikontárak alapján.	94
7.3.	Termálvíz megcsapolódáshoz köthető biofilm képződési folyamatok kísérleti tanulmányozása	97

7.4. A BTK baktériumközösségeinek összehasonlító elemzése és lehetséges szerepe a karsztosodási folyamatokban.....	104
8. Tézisek	109
9. Összefoglalás	110
10. Summary	111
11. Felhasznált irodalom	112
12. Függelék	128
13. Köszönetnyilvánítás	133
Adatlap	134

1. Rövidítésjegyzék

Általános rövidítések

ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	amplifikált riboszómális DNS restrikciós analízise
BSED	backscattered electron detector	visszaszórt elektron detektor
BTK	Buda Thermal Karst	Budai Termálkarszt
DEPC	diethyl pyrocarbonate	dietil-pirokarbonát
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis	denaturáló gradiens gélelektroforézis
DO	dissolved oxygen	oldott oxigén
EDX	energy-dispersive X-ray spectroscopy	energiadiszperzív röntgen spektroszkópia
EPS	extracellular polymeric substances	extracelluláris polimer mátrix
ETD	Everhart-Thornley electron detector	Everhart-Thornley szekunder elektron detektor
FIB-SEM	focus ion beam scanning electron microscope	kétsugaras pásztázó elektronmikroszkóp
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Luria-Bertani medium	Luria-Bertani agar
NMDS	non-metric multidimensional scaling	nem metrikus többdimenziós skálázás
OTU	operational taxonomic unit	operatív taxonómiai egység
qPCR	quantitative polymerase chain reaction	kvantitatív polimeráz láncreakció
SAS	sulfuric acid speleogenesis	kénsavas barlangképződés
SEM	scanning electron microscope	pásztázó elektronmikroszkóp
SL	surface layer	sejtfelszíni réteg
SOB	sulfur oxidizing bacteria	kén-oxidáló baktériumok
SOC	super optimal broth	
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	Tris-bórsav-EDTA-puffer
T-RFLP	terminal restriction fragment length polymorphism	terminális restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside	5-bróm-4-klór-3-indol- β -D-galaktopiranozid

2. Bevezetés

A karbonátos kőzetek kiemelten fontos termálvíz és szénhidrogén rezervoárok (Goldscheider és mtsai, 2010). A tárolók kialakulásában a felszínalatti vízáramlások jelentős szerepet játszanak oldóképességüknek köszönhetően. A felszínalatti víznek, mint földtani hatótényezőnek a szerepéből kiindulva, a karsztjelenségek (pl. barlangok, források) a felszínalatti víz közvetlen megnyilvánulásának tekinthetők. A hipogén karsztok, ezért a karsztkutatás legújabb irányvonalának megfelelően, manapság a felfedező kutatások mellett a szénhidrogén földtani kutatások szempontjából is érdeklődésre tartanak számot.

A Budai Termálkarszt a Dunántúli-középhegység karbonátos víztározó rendszeréhez tartozik. Regionális fluidumainak egyik fő megcsapolási zónája Budapesten található, ahol változatos hőmérsékletű és kémiai összetételű források törnek felszínre. Az oldott anyagokban gazdag felszálló termálvizek és a leszálló meteorikus víz keveredése tágas barlangrendszerek kialakulását eredményezte. Az egyik fő megcsapolási zóna a Rózsadomb előterében található, melynek utánpótlódása jórészt a fedetlen karbonátos felszíneken zajlik. Ezek a vizek itt langyos (20-35°C) és meleg (40-65°C) forrásokat táplálnak (Papp, 1942). A Gellért-hegy környékére kevésbé jellemző a felszíni karbonátos kőzetek jelenléte, így itt a meteorikus víz hozzájárulása korlátozott. A megcsapolt fluidumok főleg feláramló termálvizekből származnak (Erőss, 2010; Erőss és mtsai, 2012).

Az ezredfordulót követően a molekuláris biológiai módszerek széleskörű alkalmazásával párhuzamosan számos tanulmány jelent meg a recens barlangokban előforduló mikroorganizmusokról, azok lehetséges szerepéről. A kutatók egyre nagyobb érdeklődést mutattak a stabil geokémiai feltételek, állandó hőmérsékleten, napfény hiányában és minimális szerves szénforrás mennyisége mellett a karsztos barlangokban élő mikroorganizmusok iránt (Northup és Lavoie, 2001). Napjainkban a geomikrobiológiai kutatások egyik forrópontja a kénsavas barlangképző folyamatok feltárása és megértése, hiszen a mikroorganizmusok különféleképpen járulhatnak hozzá az ásványképződési folyamatokhoz és a karsztos kőzetek kénsavas oldásához is. A geomikrobiológiai folyamatok megismerése a speleológiai folyamatok felderítésén túl elősegíti a mikroorganizmusok sokféleségének, alkalmazkodóképességének, illetve a felszín alatti anyagok áramlására és a karsztvizekre gyakorolt hatások megértését.

A Budai Termálkarszt azon kevés helyek közé tartozik, ahol a termálvizek és azok karbonátos kőzetekre gyakorolt hatása a felszín közelében közvetlenül tanulmányozható.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A kontinentális karsztrendszer típusai, az epigén és a hipogén karsztosodás folyamata

A Föld felszínének mintegy 10%-át kitevő karsztos kőzetekre jellemző karsztjelenségek (barlangok, források, ásványkiválások) a felszínalatti víz közvetlen megnyilvánulásai. Magyarországon a nyílt karszterületek kiterjedése körülbelül 1350 km², az ország területének 1,45%-a, melynek 80-90%-a mészkőkarszt (Jakucs, 1971). A kontinentális karsztrendszerekben a Tóth-féle felszínalatti vízáramlási rendszerben elfoglalt helyük szerint epigén és hipogén karsztokat különítünk el (Klimchouk, 2007; Mádl-Szőnyi, 2013). Az epigén karsztrendszer intermedier és regionális áramlási pályák beszivárgási zónáinál vagy lokális áramlási pályák mentén alakulnak ki. Itt, a csapadékvízből és a talajból származó széndioxid oldó hatása a legfontosabb karsztosodási folyamat. Hazánkban tipikus epigén karsztos folyamatok jellemzők az Aggteleki-karszt, a Bükk, illetve a Mecsek egyes részein (Erőss, 2016). A hipogén karsztok fejlődése és a bennük zajló folyadékáramlás által előidézett jelenségek általában a regionális áramlási rendszerek ismeretében érthetők meg, kialakításukban számos, az epigén karsztoktól eltérő folyamat is szerepet játszhat (Mádl-Szőnyi és mtsai, 2017).

A hipogén barlangok a Föld karbonátos barlangjainak mintegy 10%-át teszik ki (Engel, 2011). Ezekre a gyakran többszintes barlangokra jellemző, hogy változó szelvényrendszerű járataik, az egészen nagy termektől a szűk átjárókig, kuszodákig terjedő üregeik függetlenek a felszíni topográfiától és a korábbi repedésekhez kapcsolódóan alakultak ki (Virág és mtsai, 2013a). Hipogén karsztos rendszerek világszerte előfordulnak, melyek közül a legismertebb barlangok a következők: az új-mexikói Carlsbad-barlang (Forti és mtsai, 2002; Engel, 2011) és a Lechuguilla-barlang (Palmer és Palmer, 2000; Polyak, 1998; Forti és mtsai, 2002), a wyomingi Lower Kane-barlang (Palmer, 2017; Engel, 2011), a romániai Movile-barlang (Forti és mtsai, 2002; Onac és Drăgușin, 2017), illetve az olaszországi Frasassi-barlang (Engel, 2011; Galdenzi és Jones, 2017). Ez utóbbi jó példa az olyan termálkarsztos barlangokra is, mint amilyenek még a dél-dakotai Black Hills nagy hévizes barlangjai (Engel, 2011; Palmer, 2017), valamint a Budai Termálkarszt (BTK) barlangjai (Leél-Őssy, 1997; Forti és mtsai, 2002; Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015).

Hazánkban a tudományos értékű vagy különleges barlangok védelméről először 1935-ben rendelkeztek, majd 1941-ben nyilvánították védetté az Abaligeti-barlangot. Az 1961. évi 18. sz. rendelet értelmében Magyarországon minden barlang védett, felfedezésük pillanatától kezdve védelem illeti őket. Az ún. „ex lege” védelem szempontjából barlangnak számít minden, a földkéreg alkotó kőzetben kialakult olyan természetes üreg, amelynek hossz tengelye meghaladja a két métert és – jelenlegi vagy természetes kitöltésének eltávolítása után – mérete egy ember számára lehetővé teszi a behatolást. A 13/1998. (V.6) KTM rendelet a barlangok nyilvántartásáról, látogatásáról, kutatásáról és a barlangok kiépítéséről nyilatkozik (22/2005. (VIII.31) KvVM rendeletben módosították). A 13/2001. (V.9.) KöM rendelet - 6. melléklet értelmében a Budai-hegységben található fokozottan védett barlangjaink száma 13, köztük a Budai Termálkarszthoz tartozó Molnár János-barlang is. A barlangok védelme kiterjed a barlangok bejáratára, a teljes járatrendszerükre, a befoglaló kőzetükre, képződményeikre, formakincsükre, bármilyen halmazállapotú kitöltésükre, a mesterségesen létrehozott bejárat vagy a barlangrészeket összekötő szakaszukra és természetes élővilágukra is (www.termeszetvedelem.hu). Magyarországon a turisztikai célból látogatható barlangok száma csak töredéke az összes barlangnak. Ilyenek az Abaligeti-, az Anna-, a Baradla-, a Lóczy-, a Pál-völgyi-, a Szemlő-hegyi, a Szent István-, a Tapolcai-tavasbarlang és a Vár-barlang. Ezek közül kettő (a Pál-völgyi és a Szemlő-hegyi) tartozik a Budai Termálkarszthoz.

3.2. A Budai-hegység földtani jellemzése

A 365 km² kiterjedésű Budai-hegységet, melynek része a Budai Termálkarszt is, északról a Pilis, nyugatról a Zsámbéki-medence, keletről a Duna, délről pedig a Budaörsi-medence határolja. Felszíni kőzetfácieseinek mintegy 53,5%-át felső triász korú földolomit teszi ki, 30%-a szintén felső triász korú dachsteini mészkő, 11,3%-a eocén nummulinás mészkő és 5,2%-a főleg negyedidőszaki édesvízi mészkő (Jakucs, 1994). Az egyes kőzettípusok térbeli elhelyezkedése a Függelékben az 1. ábrán látható. A Budai-hegység legjellemzőbb térkitöltő ásványa a kalcit, melyet a barit, a fluorit, a pirit, a markazit, a cinnabarit és egyéb szulfidásványok (cink-szulfid, metacinnabarit, galenit és egyéb elemi kén) követnek (Leél-Össy, 2017).

A mai Budai-hegység területén a késő-triászban, a karni korszak végén nagy kiterjedésű karbonát platform jött létre, majd a terület legnagyobb részén ciklusos üledékképződés zajlott. Eleinte a nagymértékű dolomitosodás (Földolomit Formáció) volt

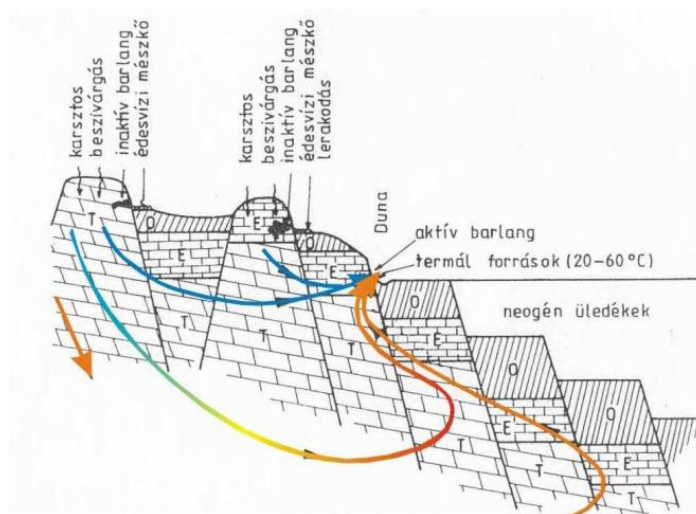
jellemző, mely gyengült, végül teljesen meg is szűnt, majd a Dachsteini Mészke Formáció keletkezett. A triász és eocén között nem ismerünk biosztratigráfiai ismert üledék típust. Az eocénban felszínre került karbonátos kőzeteknek egyenetlen, karsztosodott felszínét néhol vörös, agyagos mállástermékek borították, melyeknek maradványait időnként megtalálhatjuk a megmaradt karsztos mélyedésekben. Az üledékházat az eocénban újabb tenger általi elöntés szüntette meg, mely süllyedés következtében először a hegység keleti felén jelentkezett, míg a terület északnyugati része kiemelt szárazulat maradt. Az oligocén elején az üledékképződésben az ún. Budai-vonal játszott fő szerepet, mely Fodor és mtsai (1994) szerint egy „vak” feltolódás. A vonal környezetében a kőzetek összetöredezése miatt a repedések mentén feltörő fluidumokból kovakiválás észlelhető. A vonaltól nyugatra erőteljes lepusztulás zajlott, keletre pedig a Tardi Aggag Formáció agyagrétegei lelhetők fel. A kiscelliben a vonaltól nyugatra a Hárshegyi Homokkő, keletre pedig a Kiscelli Aggag rakódott le, melyre később a Törökbálinti Homokkő formáció is ráépült (Mindszenty, 2013).

A késő-miocénben árkos beszakadások szabdalják fel a területet, majd a térszín nagy részét elöntötte a tenger, így ennek üledékei is fellelhetők. A miocén végére az termálforrás tevékenység megindulásával édesvízi mészüledékek rakódtak le. A pliocén-pleisztocén idejére már az egész hegység tömege kiemelkedett. Erre az időszakra tehető a budai-hegységi barlangok kialakulásának kezdete is. Ezeket a képződményeket pedig holocén talajrétegek fedik 1-2 m vastagságban (Mindszenty, 2013).

3.3. A Budai Termálkarszt hidrogeológiai viszonyai

A Dunántúli-középhegység víztartó rendszeréhez tartozó Budai Termálkarszt, a Budai-hegység részeként, egy sziliciklasztos üledéssel borított karbonátos medence határán kifejlődött hipogén karsztrendszer (Eröss, 2010; Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015; Mádl-Szőnyi és mtsai, 2017). Budapest lakóterülete alatt jelentős kiterjedésű, hálózatos barlangrendszerek találhatók, melyek nemcsak elhelyezkedésük, hanem kialakulásuk tekintetében is nagyon különlegesek. Az itt megcsapolódó vizekről először Zsigmondy Vilmos (1878) írt, miszerint a Dunántúli-középhegységbe szivárgó vizek a mélységbe áramolva felmelegednek, majd termálvízként a felszínre jutnak. A hévizes áramlási rendszer első modelljét Schafarzik (1926, 1928) dolgozta ki. Ezt a modellt 1964-ben Vendel és Kisházi, majd Kovács és Müller (1980), illetve Alföldi (1981) fejlesztették tovább. Kovács és Müller koncepció modellje (1. ábra) értelmében a topográfiai magassabb helyzetű triász karbonátokon át beszivárgó víz a mélységben felmelegszik, majd a Duna mentén csapolódik meg, és keveredik egyúttal más

áramlási pályák vizeivel. A modellen inaktív és aktív barlangokat különböztetett meg, melyek közül az utóbbit a keveredési zónához kapcsolta.

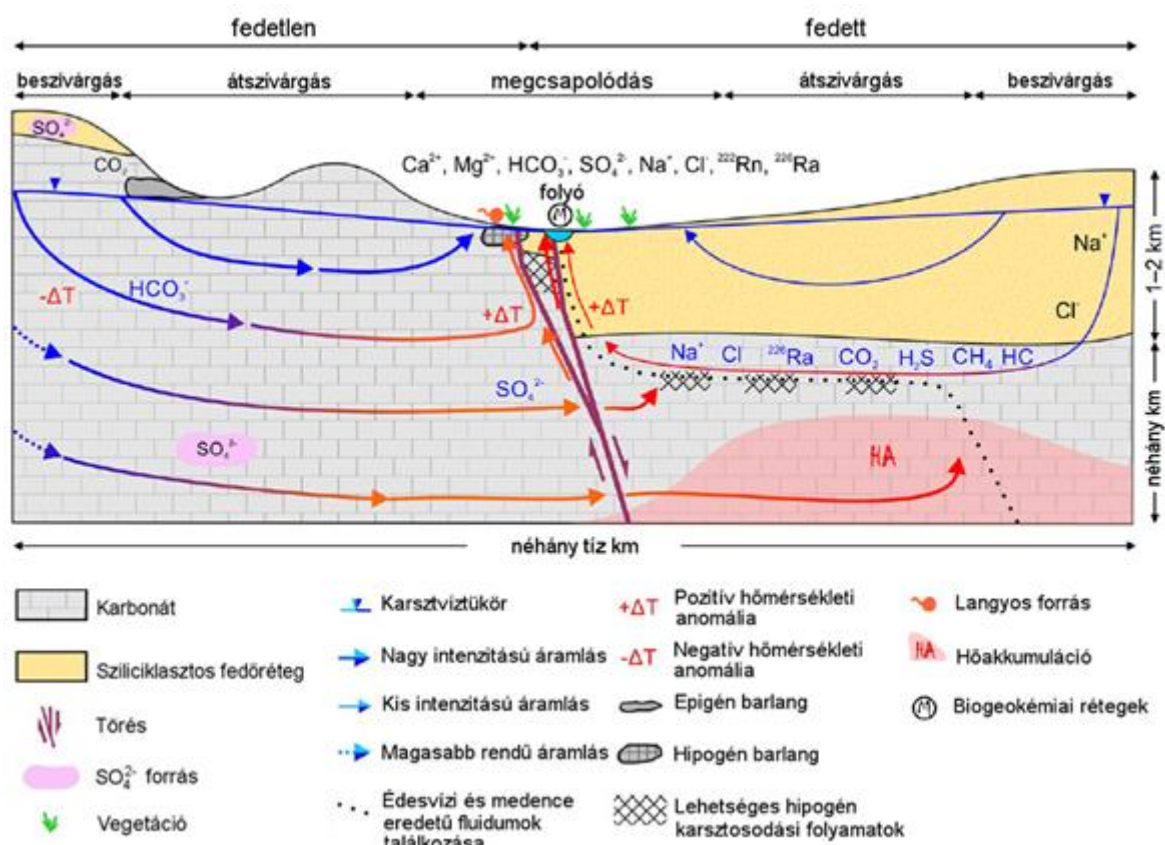


1. ábra. A Budai Termálkarszt felszínalatti vízáramlására vonatkozó koncepcionális modell Kovács és Müller (1980) alapján

A Budai Termálkarszt megcsapolódási zónájának kutatásomhoz is kapcsolódó első átfogó hidrogeológiai vizsgálatára 2007 és 2010 között került sor, ami 2011-től tovább folytatódott. A kutatás egyik legfontosabb eredménye a megcsapolódási területen található vas-oxihidroxid kiválások felismerése volt. A kiválásokból származó minták magas vas-oxid tartalmát elemanalízis vizsgálatok és Mössbauer spektroszkópiás vizsgálatok is bizonyították. Utóbbival amorf ferrihidrit ($5 \text{ Fe}_2\text{O}_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$) és goethit (FeOOH) jelenlétét mutatták ki (Kuzmann és mtsai, 2014). A biogeokémiai kiválás (Dobosy és mtsai, 2016), melyre egyfajta ásványi anyagban gazdag biofilmként is tekinthetünk, redox határfelületet jelez, és együttes előfordulása a túltelített víz felszínén úszó kalcitlemezekkel barlangképződési szintet sejtet (Mádl-Szőnyi, 2013). Ezen biofilmek rádium és nehézfém rezervoárként a források fokozott radioaktivitásához, illetve jelentős nehézfémkötő kapacitásához is hozzájárulhatnak. A forrásmedencékben és barlangokban képződő biofilmek így csapdázhatják többek között a 226-os tömegszámú rádiumot (^{226}Ra), melynek alfa-bomlása során 222-es tömegszámú radon izotóp (^{222}Rn) keletkezik. Ez utóbbi magas koncentrációja a barlangi vizekben is mérhető (Palotai és mtsai, 2005; Erőss és mtsai, 2012; Kovács-Bodor és mtsai, 2019).

E kutatás eredményeképpen napvilágot látott az a felismerés, hogy a BTK területén nemcsak a fedetlen karszt határozza meg a kémiai-geokémiai karaktert, hanem arra a fedett karszt is befolyással van (Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015). A források fizikai-kémiai paramétereinek alakulásában a fedetlen karszt mellett a fedett karszt és a fedőn átszivárgó

vizek is fontos szerepet töltenek be. A hidrogeológusok a fedett karszt alatt, az édesvíz és a medence eredetű fluidumok között egy olyan határfelületet is kimutattak, mely elválasztja a meteorikus vizeket és a fedéből átszivárgó NaCl tartalmú vizeket, így e határfelület mentén ezek a vizek a fő megcsapolódási hely felé mozognak. A numerikus modellekkel is igazolt hidrogeológiai kutatások (2. ábra) a medence felől érkező fluidumok hipogén karsztosodásban (oldódási és kiválási jelenségekben) betöltött szerepére is rámutattak (Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015).



2. ábra. Medence léptékű áramlási modell egy fedett és fedetlen karbonátos régióra (Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015 alapján)

A hazai hipogén karsztosodás egyik típusterületének tekinthető Budai Termálkarsztot Alföldi (1968) három részre osztotta. Az I. csoportba a pilisvörösvári völgy – Rákospatak vonalában és az attól északra található, a II. csoportba a József-hegy – Szépvölgy vonalában fellelhető, míg a III. csoportba az Ördögárok-vonalától D-re elhelyezkedő források és fúrások vizei tartoznak.

A BTK hármas tagolódása értelmében tehát északi, központi és déli megcsapolódási rendszerek különíthetők el egymástól (Mádl-Szőnyi és mtsai, 2018).

Az északi megcsapolódási rendszert (Csillag-hegy) langyos vizű források jellemzik, melyek hőmérséklete 18-24 °C és oldottanyag-tartalma kevesebb, mint 1000 mg^l⁻¹. A központi megcsapolódási részen (József-hegy vagy Rózsadomb) langyos (21-27 °C) és meleg (53-63 °C) vizű források törnek felszínre, előbbieket oldottanyag-tartalma kevesebb, míg a meleg vizű forrásoké több mint 1000 mg^l⁻¹. A központi rendszer esetében Erőss és mtsai (2012) két keveredési szélső tagot (egy meteorikust és egy hidrotermális) azonosítottak. A déli megcsapolódási részen (Gellért-hegy) közel azonos hőmérsékletű (33-45 °C) vizek fakadnak, melyek oldottanyag-tartalma 1500-1700 mg^l⁻¹. A Gellért-hegy megcsapolódási területen, ellentétben a központi területtel, csak hidrotermális összetevőt mutattak ki (Mádl-Szőnyi, 2013; Kovács és Erőss, 2017; Mádl-Szőnyi és mtsai, 2017; 2018).

Bár a hármas tagolódást Erőss és mtsai (2012) szintén említik, ugyanakkor a barlangképződési folyamatok jellege, illetve a rendszerek egymáshoz viszonyított helyzete alapján a Budai Termálkarsztot két részre osztották, és tanulmányaikban főként a központi és a déli rendszer kútjaival és forrásaival foglalkoztak. A továbbiakban mi is az általuk ekülönített északi (Rózsadomb területe) és déli (Gellért-hegy) rendszer szerinti felosztást követjük és az itt megcsapolódó vizekkel foglalkozunk. A legfontosabb különbségek értelmében a Gellért-hegyi területet a rózsadombi rendszerhez képest magasabb oldottanyag-tartalom, magasabb hőmérséklet, továbbá a fent már említett medence eredetű komponensek mellett magas SO₄²⁻ tartalom (>300 mg^l⁻¹) is jellemzi (Erőss, 2010).

3.3.1. A Rózsadomb és környékének barlangjai és forrásai

A Rózsadombon és környékén száznál is több kisebb-nagyobb barlangot (József-hegyi, Mátyás-hegyi, Ferenc-hegyi, Pál-völgyi, Szemlő-hegyi és a Molnár János-barlang) ismerünk, melyek teljes hossza az 55 km-t is eléri (Leél-Őssy, 1995; Leél-Őssy, 2017).

A rózsadombi barlangok elsősorban karbonát-, illetve szulfát ásványokban gazdagok. A járatok jellemzően a szép völgyi mészkő és a budai márga határán alakultak ki (az alsóbb járatok a triász mészkőbe nyúlhatnak), így a leggyakoribb ásványok itt a kalcit (CaCO₃) és a gipsz (CaSO₄ x 2H₂O) (Leél-Őssy, 1995). Az itt fellelhető karsztvizet a felszínről a barlangokba beszivárgó vizek is táplálják.

A BTK északi rendszeréhez tartozó Városligeti Széchenyi-fürdőt ellátó artézi kutat 1878-ban fejezték be és Zsigmondy Vilmos fúratta. Ekkor csaknem 74 °C-os gyógyvizet találtak itt. A kút 1246 m mélységben éri el a Dachsteini Mészkövet, melyre szűrőzve van (Alföldi és mtsai, 1968). A BTK rózsadombi megcsapolódási rendszeréhez tartozó egyik

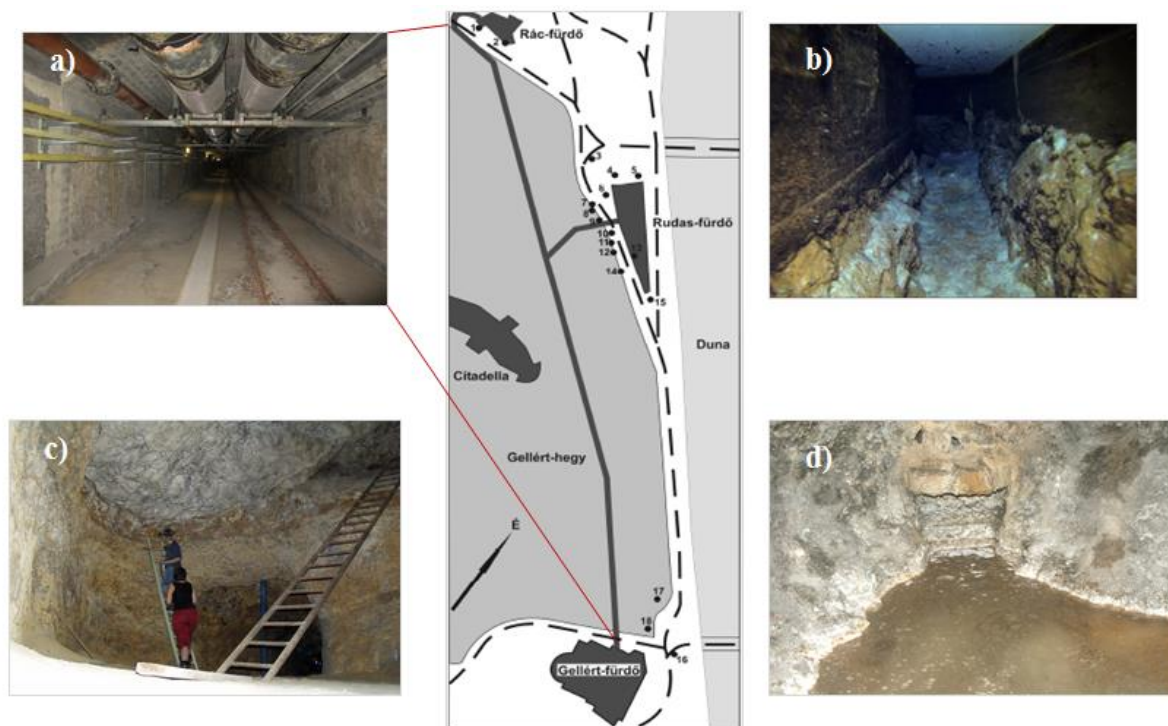
legismertebb barlang a Molnár János-barlang, mely Budapest belterülete alatt, a Frankel Leó út Lukács fürdő mögötti szakaszánál húzódik, de üregei a József-hegy gyomrába is benyúlnak. Európa legnagyobb aktív hévizes barlangjának járatrendszere ma már 7 km hosszan és 100 m mélységben ismert (Goldscheider és mtsai, 2010). Ezen a területen a hévizes barlangok üregesedésének alapvető folyamata a keveredési korrózió, ugyanis a BTK területének erős tektonizáltsága lehetővé tette a lefelé szálló hideg (oxidatívabb), illetve a felszálló meleg (reduktívabb) karsztvizek keveredését. Így jött létre az a freatikus, keveredési zóna, ami tágas üregrendszerek képződését vonta maga után (Eröss és mtsai, 2012). A hipogén barlangok kémiai paraméterei többek között a feltörő vizek minőségétől és a hőmérséklettől, a befogadó alapkőzettől és a különböző gázoktól is függhetnek. A rózsadombi barlangok kialakulásában, így a Molnár János-barlang esetében is, ez a keveredési korrózió játssza a fő szerepet (Leél-Össy és Surányi, 2003; Takács-Bolner és Kraus, 1989).

3.3.2. A Gellért-hegy barlangjai és forrásai

A Gellért-hegy északkeleti oldalában, a peremi vetőzónához kapcsolódóan számos forrást találunk. A források vize a triász dolomitból fakad, kisebb részben pedig a budai márga hasadéakai között bukkan elő (Palotai és mtsai, 2005). A megcsapolódó vizek összes oldottanyag-tartalma $1500-2000 \text{ mg l}^{-1}$, a főionok koncentrációja nem mutat térbeli változékonyságot az egyes források között (Mádlné Szőnyi, 2013). Erre a forráscsoportra települt a Rác-fürdő, a Gellért-fürdő és a Rudas-fürdő, ahol közel azonos hőmérsékletű ($35-47^\circ\text{C}$) és kémiai összetételű források fakadnak (3. ábra).

Mivel ezen a területen a különböző eredetű vizek egymást erősítő oldó hatása nem tudott érvényesülni, így más mechanizmus oldhatta ki a barlangokat. A Gellért-hegyi barlangok méreteiket tekintve sokkal kisebbek, mint a rózsadombi barlangok (pl. a Molnár János-barlang). Ugyanakkor ezekről a barlangokról jóval kevesebbet is tudunk. A triász dolomitban és az eocén márgában főként hasadékjellegű járatokat, üregeket találunk, míg az eocén mészkő megjelenése révén már oldott gömbfülkék is kialakultak a Gellért-hegy barlangjaiban. A különböző hipogén fluidumok és oldott gázok által kialakított oldásformák megjelenése nagyon változatos (Virág és mtsai, 2013b). A Gellért-táró kútjaiban és forrásbarlangjaiban is megfigyelhetők barlangi kiválástípusok, az ún. speleotémák. Ilyenek pl. a víz felszínén megjelenő kalcitlemezek is. A szén-dioxid kigázosodásának eredményeként a meleg víz túltelítetté válásával megfigyelhető jelenség nagyon gyakori a Gellért-hegy barlangjaiban. A vékony mészhártyát kezdetben a felületi feszültség tartja a víz felszínén, de a

forrásbarlang vízfelszínére cseppenő víz által keltett hullámozás le is süllyesztheti azt (3. b ábra), és a forrásbarlang vizében tovább növekedhet, vastagodhat (Virág és mtsai, 2013a).



3. ábra. A Gellért-hegyi forráscsoportra települt fürdők, a fontosabb forrásokkal és a Gellért-táróval: a) a Gellért-táró alagútrendszer; b) vízalatti felvétel a Diana-Hygieia-forrásrendszerrel, c) az Aragonit-barlang és a d) Rudas-Török forrásrendszer (a központi ábra Palotai és mtsai, 2005 alapján készült)

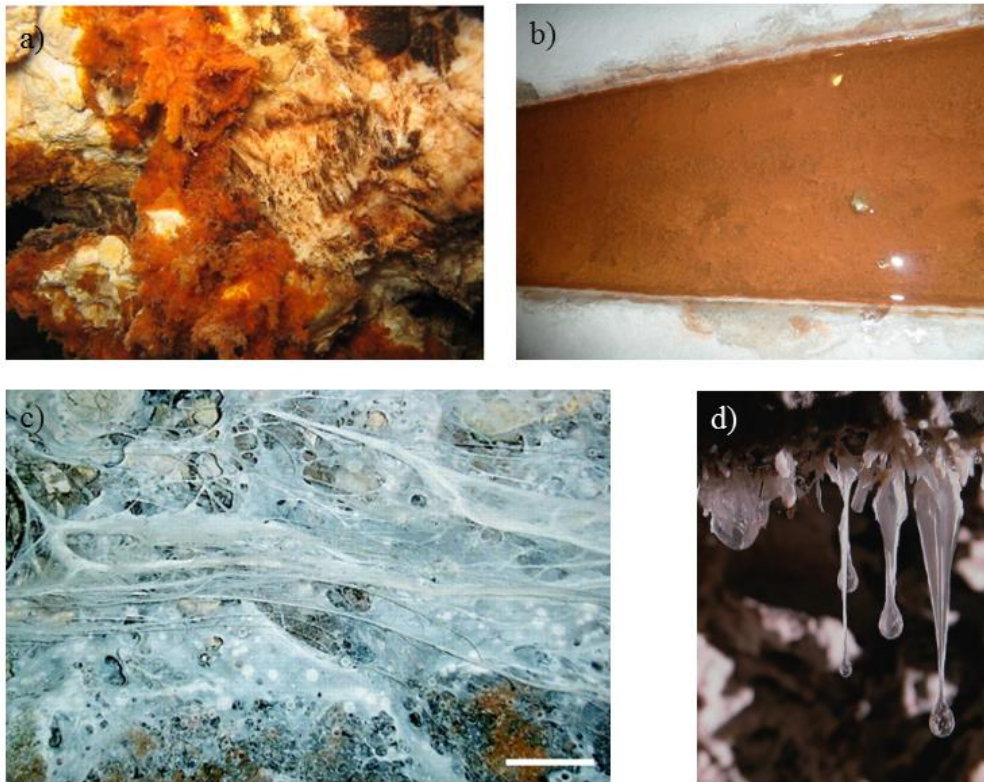
A Gellért-hegy gyomrában, a Dunával nagyjából párhuzamosan futó, több mint egy km hosszú mesterséges alagút köti össze a fürdőket, amit a 70-es években azért építettek, hogy a szökevényvizet elfogják, és lehetőség szerint hasznosítsák. A Gellért-tárónak nevezett alagút mentén összesen 4 üzemelő és 14 megfigyelő kút található (Mádl-Szőnyi, 2013). Ezek a kutak biztosítják a méltán híres termálfürdők vízellátását. A Gellért-fürdő vízellátását az 1800-as évek végéig a Szabadság-híd alatt húzódó Gellért Ősforrás biztosította, ma azonban a táróban található 4 üzemelő kút közül a GT-I és GT-III látja el vízzel. Az Erzsébet-híd és a Szabadság-híd között, a Rudas-fürdővel szemben (vízellátás: GT-II és GT-VI) a Gellért-hegy egy kis forrásbarlangjában bújkik meg a Rudas-fürdő Török forrása. A Rudas fürdő környékén a Török-forrás mellett találhatók még a következő források és kutak: Árpád-I-, II-, III-, IV-, Mátyás-, Diana-Hygieia-, Attila II-, Hídfürdő-, Kossuth-, Beatrix-, Kinizsi-, Kara Musztafa-, Rákóczi-, Udvari-, Gülbaba-forrás, Attila-, Juventus-, Hungária-kút. A Török-forrás (kb. 2 x 3 m) medencéjéhez egy 16 m hosszú, enyhén ívelt alagút vezet a

Gülbaba-forrástól. A forrás vizét a kb. 0,5 m mély medence alján fekvő cső vezeti egy gyűjtőrendszeren keresztül a Dunába. Legészakabbra a Rác-fürdő található, melynek két forrása van, a Nagy-forrás és a Kis-forrás. A Nagy-forrás a fürdő DK-i szárnyán egy 11,3 m hosszú hasadékból fakad. A Kis-forrás egy barlangforrás, mely szintén egy hasadékból tör fel (Alföldi és mtsai, 1968).

3.4. Barlangi biofilm közösségek

A barlangi környezetekben a mikrobiológiai aktivitásnak a legnyilvánvalóbb jele a polimikrobiális (pl. baktériumok, archeák, gombák, egysejtűek alkotta) biofilmek kialakulása (Barton, 2006). A biofilm forma az egyik legszélesebb körben elterjedt és legsikeresebb életmódok egyike a Földön, melyben számos elem biogeológiai folyamata zajlik különböző vizekben, üledékekben és a felszín alatti környezetekben egyaránt (Flemming és mtsai, 2016). A biofilmek meglehetősen sokféle felületen tudnak kialakulni, pl. élő szövetekben, különböző orvosi eszközökön, csővezetékrendszerekben, természetes vizekben. Kialakulásuk, szerkezetük, a résztvevő mikroorganizmusok összetétele azonban nagyon eltérő lehet (Donlan, 2002).

A hipogén karsztrendszerekben a szakirodalom különbséget tesz az egyes biofilmek között, így a barlangi folyamatokban, medencékben, üledékekben előforduló mikroba tömeget ún. mikrobiális szövedékként írják le. Ezek a szövedékek („microbial mats”) gyakran akár több centiméter vastagságúak lehetnek, ellentétben a sokkal vékonyabb (10-100 μm) mikrobiális biofilmmel (Characklis és Wilderer, 1989). Utóbbi biofilmek vékony hárttyát képezve jelenhetnek meg a víz felszínén és a felfelé jövő buborékokat is bevonhatják. A barlangok falán gyakran találkozhatunk ún. sznottitokkal vagy mikrobiális drapériákkal is (Engel, 2011) (4. ábra).



4. ábra. Barlangi biofilmek változatos megjelenési formái

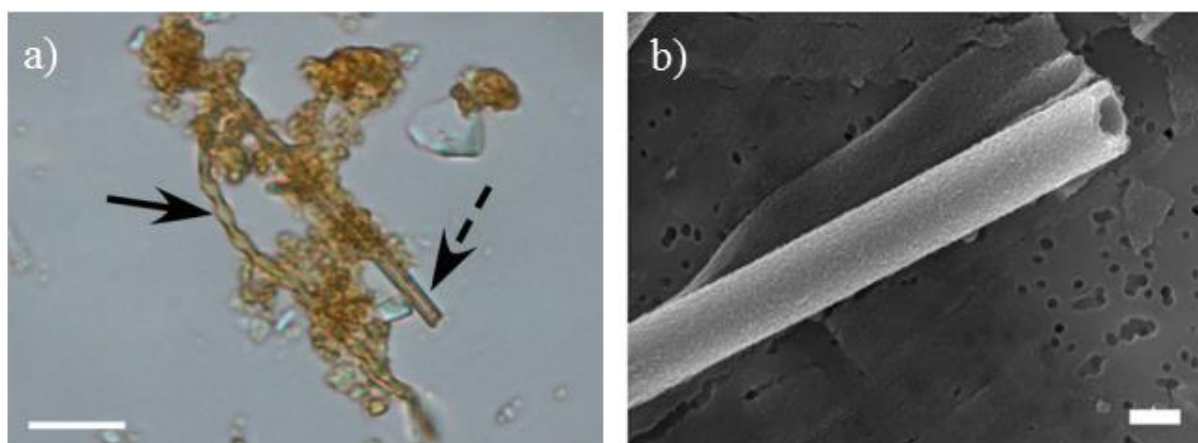
a) a Molnár János-barlang falán található vöröses színű biofilm (Kalinovits Sándor felvétele); b) a túlfolyó vizek elvezetésére szolgáló vályúban kialakuló biofilm a Gellért-táróban; c) a Lower Kane-barlang egyik folyamában található mikrobiális szövetek (Engel és mtsai, 2004a) és a d) Cueva de Villa Luz barlang sznottitjainak példáján (Barton és Northup, 2007 alapján)

A barlangi biofilmek tanulmányozására számos lehetőség áll rendelkezésünkre, a különböző mikroszkópos technikáktól, a tenyésztésen alapuló módszereken keresztül a tenyésztéstől független molekuláris biológiai eljárásokig. A tenyésztéstől független módszerek esetében a molekuláris ujjlenyomat eljárások (pl. DGGE, T-RFLP), molekuláris klónozás, kvantitatív polimeráz láncreakción és stabil izotóp próbákon alapuló vizsgálatok sokaságát használhatjuk és használják is a geomikrobiológiai kutatásokban. Az utóbbi időben azonban az új generációs szekvenálás (Illumina, SOLiD, Ion Torrent PGM, Roche 454) alkalmazása került előtérbe a barlangi szpeleotémák mikroorganizmusainak vizsgálata esetében is, mely a többi módszertől eltérően jóval nagyobb mélységben és minőségben enged betekintést a barlangi biofilmek mikrobiális diverzitásának és folyamatainak a megértésébe. Az alábbi alfejezetekben ezen technikák alkalmazásával végzett barlangi biofilm kutatások legújabb és legérdekesebb eredményeit foglalom össze a teljesség igénye nélkül.

3.4.1. Barlangi biofilmek morfológiai vizsgálata

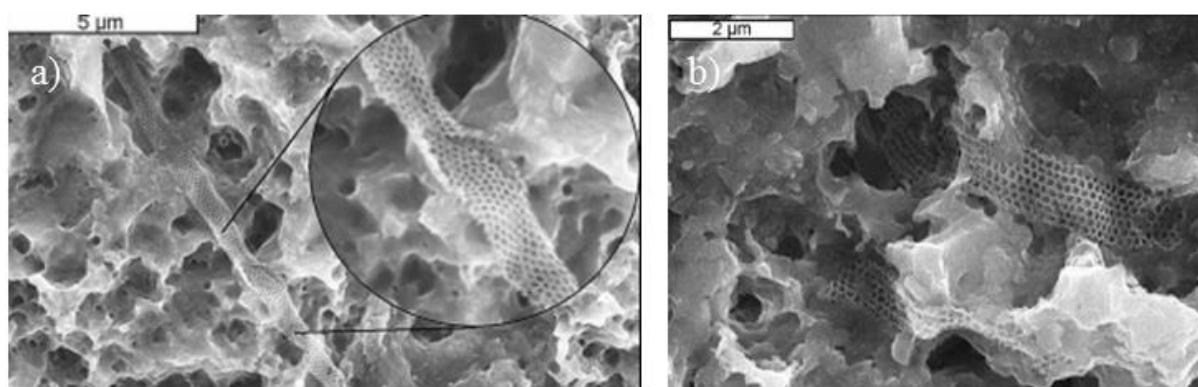
A geomikrobiológiában a különféle biofilmek morfológiai vizsgálatára gyakran használják a pásztázó elektronmikroszkópos (scanning electron microscope, SEM) technikát. A pásztázó elektronmikroszkóp segítségével saját közegükben figyelhetjük meg a kőzetek felületén kialakult biofilmek és az egyes mikroorganizmusok alaktani jellegzetességeit, valamint az általuk kiválasztott anyagokat, illetve azok elemi összetételét. Ezen vizsgálatok esetében nagyon fontos a minták megfelelő előkészítése, melyre ma már számos lehetőség áll rendelkezésünkre (Boyde és Veseli, 1972; Little és mtsai, 1991; Bray és mtsai, 1993).

A különböző, többnyire hüvelyes képleteket képző vasbaktériumokról (pl. *Sphaerotilus*, *Leptothrix* és *Gallionella* nemzetségek képviselőiről) készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételekkel gyakran találkozhatunk a szakirodalomban, hiszen ezen szervezetek széleskörben fordulnak elő ott, ahol vas és mangán ásványok vannak jelen (Van Veen és mtsai, 1978; Melim és mtsai, 2008; Cockell és mtsai, 2011; Gault és mtsai, 2011; Sawayama és mtsai, 2011). A vas- és mangánvegyületekben gazdag természetes vízi környezetekben előforduló vasbaktériumokra jellemző, hogy a ferri(III)-ionokat a hüvely felületén halmozzák fel, míg a szerves összetevőket szén- vagy energiaforrásként használhatják fel. Kedvező körülmények esetén a sejtek a hüvelyen belül növekednek, míg kedvezőtlen körülmények között a sejtek kibújnak a hüvelyből és üresen maguk mögött hagyják (5. ábra). Számos mikrobiális szövedék esetében mutatták ki csőszerű vas-oxid burkok jelenlétét (Cockell és mtsai, 2011; Gault és mtsai, 2011; Druschel és mtsai, 2008; Fleming és mtsai, 2011).



5. ábra. A különböző képleteket képző baktériumokról készített mikroszkópos felvételek a) a csavart szalaghoz hasonló, hosszú nyúlvánnal rendelkező *Gallionella*-ról (folytonos nyíl) és *Leptothrix* csőszerű hüvelyéről (szaggatott nyíl) készült fénymikroszkópos felvételek (mérték: 10 μ m) (Cockell és mtsai, 2011 alapján) b) *Leptothrix* hüvelyéről készült pásztázó elektronmikroszkópos felvétel (mérték: 1 μ m) (Fleming és mtsai, 2011 alapján)

Szokatlan hálószerű, fonalas képződményekről (6. ábra) először Melim és mtsai (2008) számoltak be a Guadalupe-hegység barlangi speleotémáinak esetében. Ezen szálak hosszúsága azonban gyakori összetöredezettségük miatt, akár a 6. b ábra esetében, nem volt mérhető. A filamentumok átmérője 300-1000 nm (átlagosan 590 nm) mérettartományba esett. A meglehetősen érdekes hálószerű képződményeket energiadiszperzív röntgen spektroszkópiával (energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX; különböző szilárd minták, vékony rétegek, biofilmek elemi összetételének vizsgálata mikrométeres felbontással) is vizsgálták. Az EDX analízis alapján a filamentumok több kalciumot, oxigént és szenet tartalmaztak, mint a környezetükben található kalcit. A szálak magas széntartalma és morfológiája alapján azok biogén eredetét valószínűsítették. A szerzők feltételezték, hogy a hálózatos struktúra esetleg a sejtfal alkotóelemeként is ismert SL (surface layer) sejtfelszíni réteg, ugyanis egyes Gram-negatív baktériumokban és ősbaktériumokban is megfigyeltek szimmetrikus hatszögletű elrendeződésű fehérje egységeket.



6. ábra. Hálószerű, fonalas képződményekről készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételek a Guadalupe-hegység barlangi speleotémái esetében (Melim és mtsai, 2008 alapján)

A fáziskontraszt mikroszkóp lehetőséget nyújt a sejten belüli képletek (pl. zárványok), illetve sejtfelszíni struktúrák (pl. hüvely) részletes vizsgálatára. A Kentucky államban található hipogén eredetű Parker-barlang mikrobiális szövetékében fáziskontraszt mikroszkópiával megtalálhatók voltak a fonalas baktériumok sejten belüli kén zárványokkal (Angert és mtsai, 1998). A hipogén Frasassi-barlangrendszerben képződött biofilmeket fáziskontraszt mikroszkópia segítségével Macalady és mtsai (2006) is vizsgálták. A mikroszkópos felvételek alapján a vizsgált barlangi biofilmből intracelluláris kén granulومات felhalmozó *Beggiatoa* és *Thiothrix*-szerű sejteket azonosítottak. Energiadiszerziós spektrométer analízis módszerével is megerősítést nyert a kénfelhalmozás jelenléte a fonalas képződményekben.

Az ausztriai Bad Gastein Franz Josef-forrásának biofilmjét Weidler és mtsai (2007) tanulmányozták pásztázó elektronmikroszkópiával. A forrásbarlangban természetesen kialakult biofilmek részletes morfológiai vizsgálata mellett, üveglemezekre kitapadt sejteket is tanulmányoztak (11 napos inkubációt követően). A SEM analízis során változatos morfológiájú sejteket figyeltek meg mind a kőzeteken, mind a mesterséges üvegfelületen. A különböző fonalas, illetve görbült pálca alakú mikrobák mellett a *Nitrospira* nemzetségre jellemző spirális sejtalakot kivétel nélkül mindegyik felületről készült felvétel esetében megtalálták. A fonalas baktériumokat *Thiobacillus*-ként azonosították, melyek szintén mind a kőzet, mind az üvegfelületeken megfigyelhetők voltak.

3.4.2. Barlangi biofilmek tanulmányozása tenyésztési és molekuláris klónozási módszerekkel

A tenyésztési alapuló módszereket és a molekuláris klónozás technikáját régóta alkalmazzák a barlangokban található mikroorganizmusok sokféleségének feltárására (Jones, 2015). A tenyésztési alapuló vizsgálatokat a különböző geomikrobiológiai kapcsolatokat, illetve kölcsönhatások felderítésére, pl. a mikroorganizmusok közreműködésével végbemenő kalcium-karbonát kicsapódás tanulmányozására, melyről részletesebben a 3.5. fejezetben írok. A tenyésztési diverzitás elemzések során azonban gyakori, hogy csak a tenyésztési körülményekhez legjobban alkalmazkodni képes közösség alkotó fajok tenyésztésbe vonására és meghatározására nyílik lehetőség (Amann és mtsai, 1998). Számos mikroorganizmus különleges, laboratóriumi körülmények között rendkívül nehezen, vagy ma még nem reprodukálható környezeti igényekkel rendelkezik. Különösen igaz ez olyan komplex rendszerek esetében, mint amilyenek a biofilmek.

A tenyésztési módszerek korlátai miatt a molekuláris klónozás módszerével kezdték tanulmányozni a barlangok mikrobiális közösségeit. A 16S rRNS gén vizsgálatán alapuló molekuláris klónozás módszerét az elmúlt évtizedekben széles körben alkalmazták a barlangbiológiai vizsgálatokban és ez jelentősen bővítette tudásunkat a barlangi környezetek mikrobiális diverzitását illetően is (Pace, 1997; Hugenholtz és mtsai, 1998). Napjainkig mintegy 14000 molekuláris klón szekvenciáját (16S rRNS, 18S rRNS és 23S rRNS) helyezték el különböző adatbázisokban barlangi és karsztos környezetekből (Lee és mtsai, 2015). Az alábbiakban e két módszerrel (tenyésztéssel és molekuláris klónozással) vizsgált különböző biofilmek mikrobiális diverzitás vizsgálati eredményeit gyűjtöttem össze a teljesség igénye nélkül.

A legtöbb barlangi környezetből a Proteobacteria, az Actinobacteria, a Firmicutes és a Bacteroidetes törzsek tagjainak domináns előfordulásáról számoltak be. A Proteobacteria törzs képviselői számos barlang esetében (pl. az olaszországi Frasassi-barlangban, az új-mexikói Lechguilla-barlangban, az ausztráliai Nullarbor-síkság egyik barlangjában, a szlovéniai Pajsarjeva jama barlangban) a legnépesebb csoportot alkották (Porter és mtsai, 2009; Macalady és mtsai, 2006, Northup és mtsai, 2003; Holmes és mtsai, 2001; Pašić és mtsai, 2009). A Proteobacteria törzsön belül az Alpha-, a Beta-, a Gamma-, a Delta és az Epsilonproteobacteria osztályok tagjai egyaránt képviseltették magukat a karsztos környezetekben (Barton, 2015).

Az Alphaproteobacteria osztály képviselői gyakran fordulnak elő szubterresztrikus környezetekben. Különösen a *Rhizobiales* nemzetség tagjai, úgymint a *Marteella mediterranea* és *Aurantimonas altamirensis*, jelentősek barlangokban (Jurado és mtsai, 2006). Az *Acidiphilium* és *Acidocella* fajok képviselői főként savas barlangi környezetekből kerültek elő (Kimura és mtsai, 2011). A szintén Alphaproteobacteria osztályhoz tartozó *Wolbachia* nemzetség tagjait a Wind Cave-barlangban található ugróvillások rendjébe tartozó *Folsomia candida* faj endoszimbiontijaként írták le (Saiz-Jimenez, 2015).

A Betaproteobacteria osztály tagjai, különösen a *Thiobacillus* nemzetség képviselői, jelentős szerepet tölthetnek be a kén oxidációjában. Ezen osztály képviselőinek jelenléte vagy hiánya meghatározó a szulfidos karsztos környezetekben (részletesen lásd az 3.5. fejezetben). Az olaszországi szulfidos vizű Frasassi-barlangban található biofilmek vizsgálata során a molekuláris klónok nagy része a *Thiomonas* spp. illetve *Thiobacillus denitrificans* fajokkal mutatott nagyfokú szekvenciahasonlóságot. Az előző fejezetben már említett ausztriai radioaktív, meleg vizű (45,6 °C) Franz Josef-forrás biofilmjéből a molekuláris klónok többsége szintén *Thiobacillus* fajokkal mutatott rokonságot (Weidler és mtsai, 2007). A Betaproteobacteria osztályba tartozó *Gallionella* és *Leptothrix* nemzetségek képviselői olyan környezetekben fordulnak elő, ahol vas- és mangán ásványok vannak jelen, ezen nemzetségekről a 3.4.1. fejezetben írok részletesen. Az osztályhoz tartozó metilotróf baktériumok (pl. *Methylothermobacter*, *Methylophilus* és *Methylovorus* spp.) a romániai Movile-barlang esetében fordultak elő nagy arányban.

A Gamma-, illetve Epsilonproteobacteria osztályba tartozó kén-oxidáló baktériumok szerepe, melyről részletesebben szintén a 3.5. fejezetben írok, a kénsavas barlangképző folyamatokban lehet jelentős. Az olaszországi Frasassi-barlang biofilmjének vizsgálata során a molekuláris klónok döntő többsége a fonalas, kén-oxidáló *Thiothrix* spp.

(Gammaproteobacteria) fajokkal mutatta a legnagyobb szekvenciahasonlóságot (Macalady és mtsai, 2006, 2007). Később megállapították, hogy a kén-oxidáló baktériumok niche-elkülönülésében a szulfid és az oxigén koncentráció, továbbá a víz áramlása lehetnek meghatározóak (Macalady és mtsai, 2008). A barlang mennyezetén és falán található sznottitok esetében a molekuláris klónok a legnagyobb szekvenciahasonlóságot a litoautotróf *Acidithiobacillus thiooxidans* baktériumfajjal mutatták. A wyomingi Lower Kane-barlang szulfidos vizét és biofilmjét az utóbbi években részletesen vizsgálták (Engel és mtsai, 2003, 2004a; Porter és Engel, 2008). A mintákban itt is az Epsilonproteobacteria osztály dominanciája volt kimutatható az anaerob kemolitotróf *Sulfuricurvum* és *Sulfurospirillum* nemzetségekkel (Engel és mtsai, 2003; Rosetti és mtsai, 2003). A Nullarbor-síkság egyik barlangjának vizsgálata során Holmes és munkatársai (2001) a molekuláris vizsgálatok során a Gammaproteobacteria osztályhoz tartozó organotróf *Pseudomonas* és *Pseudoalteromonas* nemzetségeket azonosították. Az Ausztrália délnyugati részén található Nullarbor-síkság egy hatalmas mészkőkarsztos rendszer része. A síkságon mintegy 100 barlang található, melyek kiterjedt járatokkal rendelkeznek. A területen található barlangok egyre népszerűbbek a bűvárok körében is, akik arról számoltak be, hogy biofilmek szinte az összes felfedezett barlangi járatban megtalálhatók, de előfordulásuk szinte kizárólag a teljesen vízzel kitöltött, sötét járatokra korlátozódik (Tetu és mtsai, 2013). A Gammaproteobacteria osztályhoz tartozó koliform szervezetek (pl. *Escherichia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*) megjelenése a barlangokban általában fekális szennyeződésre utal. A karsztos környezetek számos veszélynek vannak kitéve, melyek nagy része antropogén hatásoknak köszönhető. A karsztvizek minőségével számos tanulmány foglalkozott (Seman és mtsai, 2015; Mulec és mtsai, 2012; Gaálová és mtsai, 2014; Chelius és mtsai, 2009; Johnston és mtsai, 2012). A fakultatív anaerob, Gram-negatív festődésű, pálcika alakú, spórát nem képző Enterobacteriaceae család tagjai a Szlovák-karszt barlangjaiban is előfordultak. A szennyezés és a mezőgazdasági tevékenység között találtak korrelációt Seman és mtsai (2015).

A különböző barlangi környezetekben a kén-oxidáló baktériumok mellett a szulfát-redukáló baktériumok is fontos szerepet tölthetnek be a kénhez köthető mikrobiális anyagcserében. A szulfát-redukáló szervezetek többsége a Deltaproteobacteria osztályhoz tartozik. Ezen szervezetek gyakran találhatók meg felszín alatti karsztos környezetekben, illetve barlangokban (Saiz-Jimenez, 2015). A Deltaproteobacteria osztályhoz tartozó *Desulfocapsa* nemzetség képviselőit Engel és mtsai 2003-ban és 2010-ben is kimutatták a

Lower Kane-barlangból, illetve Macalady és mtsai 2006-ban a Frasassi-barlangból a *Desulforhabdus* és *Desulfobacter* nemzetségek mellett.

A hipogén barlangi környezetben a magas relatív páratartalom, a viszonylag állandó hőmérséklet kedvez a heterotróf baktériumok, különösen az Actinobacteria törzsbe tartozó szervezetek növekedésének. A mikrobiális diverzitás feltárására irányuló tenyésztésen alapuló módszerekkel világszerte, az alkalmazott táptalaj összetételétől függetlenül az aerob heterotróf baktériumok között az Actinobacteria törzs képviselőit találták meg a legnagyobb számban (Cañaveras és mtsai, 2001; Chelius és Moore, 2004; Groth és mtsai, 2001). Az Actinobacteria törzshöz tartozó *Streptomyces* fajok különösen nagy számban fordulnak elő ezen környezetekben (Saiz-Jimenez, 1999). Ortiz és mtsai (2015) szintén az Actinobacteria törzs, különösen az Actinomycetales rend dominanciájáról számolt be a Karchner barlangok függőcsepkövei (sztalaktit) esetében. Az Actinomycetales rend képviselői leginkább a felszínhez közeli karsztos környezetekben voltak dominánsak (Barton, 2015). Az Actinobacteria törzs nyomaira könnyen rálelhetünk a különböző barlangokban, hiszen színes (sárga, fehér, szürke), szabad szemmel is látható telepeket hozhatnak létre (Saiz-Jimenez, 2015). Az Altamira-barlangban a mikrobiális aktivitás egyértelműen észlelhető a barlangok falán, mennyezetén, ahol számos színes telep található. A szürke telepekből készített 16S rRNS gén alapú klontárban az Actinobacteria törzs dominált (Cuezva és mtsai, 2012).

A Firmicutes törzs a Proteobacteria és az Actinobacteria törzset követően a harmadik legabundánsabb csoport a barlangi környezetekben. A Firmicutes törzs tagjai, ellentétben az Actinobacteria törzsszel, többnyire mélyebb karsztos környezetekben fordulnak elő (Barton, 2015). A törzsön belül a *Bacillus* nemzetség tagjait találták meg pl. számos ausztráliai barlang esetében. A Firmicutes törzs termofil képviselői a Budai Termálkarszt barlangjaiból is előkerültek, melyet a 3.6. fejezetben ismertetek részletesen.

A Bacteroidetes törzs képviselői széles körben megtalálhatóak Európa, illetve Észak-Amerika barlangjaiban is. Előfordulásuk leginkább magas sótartalmú környezetekhez, alacsony hőmérséklethez, illetve sötétséghez kötött (Saiz-Jimenez, 2015). A Nullarbor-síkság barlangjából Holmes és mtsai (2001) szintén azonosították a Bacteroidetes törzs (*Cytophaga* és *Flavobacterium*) tagjait.

A fentiekben már említett Nullarbor-síkság barlangjának biofilmjei között a már említett Proteobacteria és Bacteroidetes törzsek mellett a Nitrospirae törzs képviselői is előkerültek, a törzshöz tartozó *Nitrospira* nemzetséggel. A klónok 12%-a az autotróf nitrit-oxidáló *Nitrospira moscoviensis* fajjal mutatta a legnagyobb szekvenciahasonlóságot a magas

nitrát és szulfát tartalmú barlangrendszerben (Holmes és mtsai, 2001). Számos európai barlang jellegzetes sárga telepeiből is izolálták már a *Nitrospira* nemzetség képviselőit (Saiz-Jimenez, 2015). Napjainkban egyre több bizonyíték utal arra, hogy a nitrogén ciklusnak is meghatározó szerepe lehet a barlangi környezetekben (Ehrlich és Newman, 2009; Marks és mtsai, 2012).

3.4.3. Barlangi mikrobaközösségek vizsgálata új generációs genomszekvenálással

Az utóbbi években a barlangi közösségek ökoszisztémájának dinamikájába új betekintést adtak a különböző metagenom vizsgálatok (Ortiz és mtsai, 2014; Tetu és mtsai, 2013; Jones, 2012). A Kartchner Caverns (Arizona, USA) karbonátos barlangjainak metagenom vizsgálata során a piroszekvenálás közel 400 000 parciális 16S rRNS szekvencia adatot eredményezett a vizsgálatba vont 10 minta esetében (Ortiz és mtsai, 2014), ami összehasonlítva az 3.4.2. fejezetben említett 14 000 molekuláris klónszekvenciával több mint 28-szoros adatmennyiség. Sajnos azonban a barlangból nyert taxonok nagy részét nem lehetett azonosítani, mivel a prokarióta taxonok döntő része tenyésztett képviselő hiányában a tudomány számára ma még ismeretlen volt. A metagenom és a kvantitatív valós-idejű PCR (qPCR) vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a vizsgált barlangban a Bacteria domén tagjai domináltak, ezt pedig az Archaea domén tagjai követték. A Bacteria doménen belül a Proteobacteria törzs (megjelentek még az Acidobacteria, Chlorobi, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes, Nitrospirae és a Planctomycetes törzsek tagjai), míg az Archaea doménen belül a Thaumarchaeota törzs előfordulása volt jellemző. Ez utóbbi csoportból ammónia-oxidáló ősbaktériumokat azonosítottak nagy számban.

A vizsgálatok során kimutatták, hogy nagy arányban jelentek meg a DNS-hibajavításban fontos gének is, amit a szerzők a barlangi mikrobák magas kalcium koncentráció okozta stresszhez való alkalmazkodásaként értelmeztek. Az ausztráliai Weebubbie-barlang üledékének metagenom vizsgálata is a Proteobacteria törzs és a Thaumarchaeota törzshöz tartozó ammónia-oxidáló ősbaktériumok dominanciáját és fontosságát mutatta ki (Tetu és mtsai, 2013).

A Kínában található Jinjia mészkőbarlang falán található lerakódások és üledék nagy áteresztőképességű piroszekvenálással történő vizsgálata szintén diverz baktériumközösségeket tárt fel a Gammaproteobacteria osztály és az Actinobacteria törzs dominanciájával (Wu és mtsai, 2015). Számos olyan szervezetre jellemző filotípust mutattak

ki, melyek a barlangban feltehetőleg kemolitoautotróf anyagcserét folytatnak. Ilyenek pl. a *Nitrospira* és *Nitrosospira* nemzetségek képviselői, melyek tenyésztésbe vont képviselői képesek szerves C forrásokból (CO_2 , HCO_3^- , CO_3^{2-}) szerves anyagaikat felépíteni.

A Frasassi-barlang erősen savas kémhatású (pH 0-1) sznottitjainak metagenom vizsgálati eredményei azt mutatták, hogy az elsődleges termelésben az *Acidithiobacillus* fajok vesznek részt, melyek a közösség több mint 70%-át alkotják. A szélsőségesen alacsony környezeti pH értékekhez való adaptáció során a sznottitokban előforduló mikroorganizmusok sejtjeikben neutrálishoz közeli pH-t tartanak fenn. Ennek érdekében a membránon keresztül specifikus ion transzport folyamatokat működtetnek. Az ion transzporterek közül a szekvencia találatok többsége az ún. P-típusú ATP-ázok közül került ki, melyek kulcsfontosságúak a rendkívül alacsony pH-n való túléléshez. Egyre több bizonyíték utal arra is, hogy a baktériumok membránjában található, szterolokkal analóg funkciót betöltő, hopanoidoknak is fontos szerepe lehet a membrán permeabilitás csökkentésében (Jones és mtsai, 2012). Az is megerősítést nyert, hogy ezek a szervezetek a kén oxidációjára az ún. Sox-rendszert használják (Jones és mtsai, 2012; Hamilton és mtsai, 2015). A Sox enzimszisztéma négy központi fehérje komponensből áll, a SoxAX-ből, a SoxB-ből, a SoxYZ-ből illetve a SoxCD-ből. A szulfid és tioszulfát oxidálása egészen szulfátig akkor lehetséges, ha a sejt rendelkezik mind a négy komponenssel. A Sox multienzim komplex számos Epsilonproteobacteria osztályba tartozó nemzetség (*Sulfurovum*, *Nitratiruptor*, *Sulfurimonas*, *Arcobacter* spp.) genomjában megtalálható. A Frasassi-barlang biofilmjeiből nagy arányban kimutatható kén-oxidáló *Sulfurovum* és *Sulfuricurvum* fajok genomjainak vizsgálata során hiányos Sox multienzim rendszereket, illetve a szulfid-kinon-oxidoreduktázzal homológ géneket találtak, ami arra engedett következtetni, hogy a szulfid oxidációja a *Sulfurovum* fajok esetében nem lehetséges egészen szulfátig. Ellentétben a barlangban található kevésbé abundáns *Sulfuricurvum* és *Arcobacter* fajokkal, ahol a Sox-rendszer teljes komplexe megtalálható volt (Hamilton és mtsai, 2015).

Az *Acidithiobacillus* fajok elterjedését és az erre ható különböző tényezők közti kapcsolatokat két olaszországi (Frasassi és Acquasanta) és két mexikói (Villa Luz és Luna Azufre) barlang sznottitjain vizsgálták (Jones és mtsai, 2016). Az elszigetelt barlangokban található különböző populációk funkciógénjeinek összehasonlítására metagenomikai megközelítést alkalmaztak. Az olasz barlangokban található *Acidithiobacillus thiooxidans* fajok különféle kén-oxidációs útvonalakat használnak és számos, a mexikói barlangokban előfordulóktól különböző anyagcsere képességgel rendelkeznek. A szerzők egy evolúciós

modellben az eltérés okaként, a barlangrendszerek felületének különböző ősi populációk általi véletlenszerű kolonizációját valószínűsítették.

3.5. Mikroorganizmusok részvétele karsztosodási folyamatokban

A mikroorganizmusok befolyásolása révén számos geológiai folyamat zajlik mélyen a felszín alatt. A felszín alatt élő mikroorganizmusok az extrém környezethez való molekuláris és fiziológiai adaptációs képességük miatt is az érdeklődés középpontjában állnak. Mikrobiális aktivitás eredményeként az ásványképződések (pl. kalcit és aragonit) néhány típusa is végbe mehet (Ehrlich, 2002). Így a szubterresztrikus mikrobaközösségek feltárása a geomikrobiológiai folyamatok, illetve a mikroorganizmusok extrém környezetekhez való adaptációjának megértése szempontjából is nagyon fontos.

Napjainkig számos tanulmány született a biogén tényezők karsztos folyamatokra gyakorolt hatásáról. E munkák hangsúlyozzák a mikroorganizmusok szerepének fontosságát a kőzetek felszínének és belsejének kolonizálása során a karsztosodási folyamatokban. Az autotróf, illetve heterotróf mikroorganizmusok különböző korrozív hatású anyagokat termelhetnek, melyek a CaCO_3 oldásához járulhatnak hozzá. Más mikroorganizmusok pedig a gipszben levő szulfátot vagy a vas-mangán-oxidokat tudják redukálni. A barlangokban végbemenő kiválási és oldódási folyamatok így hozzájárulhatnak a karsztos speleotémák, többek között a vas-és mangán-oxidok, szilikátok, illetve a különböző kénes lerakódások kialakulásához, továbbá a mészkő oldásához is (Northup és Lavoie, 2001).

Számos, a Proteobacteria törzsbe tartozó baktérium képes a különböző vas-vegyületek felhalmozására, karbonátok biomineralizációjára, illetve kiválásuk elősegítésére (Northup és mtsai, 2003; Rusznyák és mtsai, 2011). A hipogén Lechuguilla-barlang vas- és mangán-kiválásaiból vas- és mangán-oxidáló (*Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Leptospirillum*, *Stenotrophomonas*), illetve -redukáló (*Pantoea*) baktériumokat azonosítottak (Northup és mtsai, 2003). A Budai Termálkarszt területén is találhatunk vas és mangán kiválásokat, melyek kialakulásának hátterében szintén mikroorganizmusok közreműködése feltételezhető. Ilyen kiválások találhatók az északi rendszerhez tartozó Ferenc-hegyi barlangban is, amelynek bizonyos járataiban hidromagnezit jelenlétét állapították meg. A víztartalmú bázikus magnézium-karbonát alatt fekete bevonat figyelhető meg, melyről kémiai elemzések kimutatták, hogy Ba-tartalmú mangán-oxid. Erről a mangános képződményről is

feltételezhető, hogy mikroorganizmusok közreműködésével keletkezett (Sásdi és Virág, 2013).

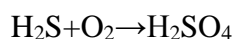
A barlangokban különösen gyakori mikrobiológiai anyagcserefolyamat a kemoszintézis (Barton és Jurado, 2007). Az afotikus és csekély szervesanyag-tartalmú környezetekben csak azok a fajok képesek megélni, amelyek alkalmazkodni tudtak ezekhez a feltételekhez. Ezzel magyarázható a kemoautotrófia jelentősége számos barlangban (Sarbu és mtsai, 1996; Kumaresan és mtsai, 2014). A különböző barlangokban az egyik legmeghatározóbb folyamat a kénre épülő anyagcsere, hiszen a kén-oxidáló baktériumok (SOB) szerepe a kénsavas barlangképző folyamatokban (sulfuric acid speleogenesis, SAS) vitathatatlan. A SOB metabolizmusuk melléktermékeként kénsavat képeznek, ezáltal nagyon fontos szerepet tölthetnek be a karbonátok oldásában (Engel, 2011). Az Epsilon- (pl. *Sulfuricurvum* nemzetség), Gamma- (pl. *Beggiatoa* és *Thiothrix* nemzetségek) és Betaproteobacteria (pl. *Thiobacillus* nemzetség) osztályba tartozó kén-oxidáló baktériumok a redukált kénvegyületeket oxidálják szulfáttá. A fentebb említett Gammaproteobacteria osztályhoz tartozó taxonok, akárcsak az Epsilonproteobacteria osztály képviselői ritkán találhatók meg nem szulfidos karsztrendszerekben. Kénsavas barlangképződés nyomaival becslések szerint a barlangok mintegy 5-10%-ában találkozhatunk a Földön. A ma is aktív barlangrendszerek közül pedig csak egy-két barlangban (Villa Luz barlangrendszer, Mexikó; Lower Kane-barlang, USA; Movile-barlang, Románia; Frasassi-barlang, Olaszország; Edwards karsztvíztározó, USA) fedezhető fel napjainkban is a SAS (Paterson és Engel, 2015).

A hipogén karsztosodási folyamatok fontos hatótényezője a kénhidrogén (H_2S), illetve a kénsav (H_2SO_4). A kénhidrogén számos forrásból származhat, pl. vulkáni tevékenység során, kén-tartalmú szerves anyagok lebontásából, szénhidrogénekből, bakteriális szulfát, illetve kén redukciója révén, továbbá felszabadulhat evaporitokból és szulfidokból is (Palmer, 2007).

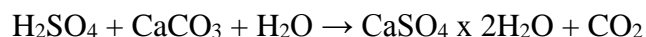
A kénhidrogén az alábbi egyenlet szerint képes a karbonátok oldására:



A mélységi eredetű kénhidrogén (H_2S), mely általában eleve karbonátokra túltelített vízből származik, a vízfelszín közelében oxigéndús vízzel keveredik és kénsavvá alakul (Engel, 2011).



A kénsavvá oxidálódott kénhidrogén és a karbonátos kőzet reakciójából gipsz és széndioxid képződik az alábbi egyenlet szerint:



A felsorolt oldási folyamatokat az oxigén limitálhatja, mely azonban a kemolitoautotróf baktériumok jelenlétében oxigénhiányos környezetben, így mélyebb vízrétegekben is lezajlódhat (Engel és mtsai, 2004b). A már említett kemolitotróf kén-oxidáló szervezetek tehát kénsav képzésük révén savas környezetet hoznak létre. Oxigén hiányában vagy alacsony O_2 -koncentráció ($<1\text{mg/L}$) mellett azonban egyes kén-oxidáló szervezetek nitrátot (NO_3^-) használhatnak elektronakceptorként (Macalady és mtsai, 2006).

A barlangokban megtalálható különböző ásványi kiválások, szpeleotémák, pl. cseppkövek, kalcitlemezek vagy a „hegyitej” (moonmilk) nagy részének képződéséhez is hozzájárulhatnak a mikroorganizmusok (Northup és Lavoie, 2001). Számos tanulmány született a különböző baktériumok kalcium-karbonát kicsapódását elősegítő képességéről mind természetes, mind laboratóriumi körülmények között (Krumbein, 1979; Chafetz és Buczynski, 1992; Ercole és mtsai, 2007). A baktériumok mellett azonban a gombák, illetve az algák is részt vehetnek a karbonátok precipitációjában. A baktériumok, illetve a gombák a karbonátot extracellulárisan választhatják ki, fotoszintézisük, ammonifikációjuk, denitrifikációjuk, szulfát-redukciójuk vagy anaerob szulfid-oxidációjuk során. Ezek a folyamatok a HCO_3^- koncentrációjának növekedésével járnak, ami alkalikus környezetet eredményez és kalcium-karbonát kicsapódással jár. A különféle baktériumok a karbonátot eltérő mennyiségben, formákban és kristályszerkezetben tudják kiválasztani hasonló szintetikus közegből (Ferrer és mtsai, 1988; Cacchio és mtsai, 2004, Ercole és mtsai, 2007). A kalcium-karbonát ásványtani jellegének, morfológiájának kialakulásában a biofilmek esetében az extracelluláris polimer vegyületek (EPS) valószínűleg alapvető szerepet játszanak (Ercole és mtsai, 2007).

A „hegyi tej” a mészkő barlangokban kalcitból vagy aragonitból, míg a dolomit barlangokban hidromagnezitből áll (Hill és Forti, 1997). Kialakításában a mikroorganizmusok széles köre vehet részt, különösen a *Streptomyces* nemzetségbe tartozó baktériumok, de gombák, algák, sőt egysejtűek is nagy számban izolálhatók erről a kiválástípusról. Az észak-spanyolországi Altamira-barlangban a hidromagnezit „hegyitej” kiválás vékony kéreg formájában van jelen. Ezek a hidromagnezit és aragonit tükrökristályok nyálkás vagy fonalas biofilmbe ágyazódnak, melyet főleg a *Streptomyces* nemzetség tagjai alkotnak (Cañaveras és mtsai, 1999). Gonzalez és munkatársai (2006) a Crenarchaeota törzs jelenlétét is kimutatták a

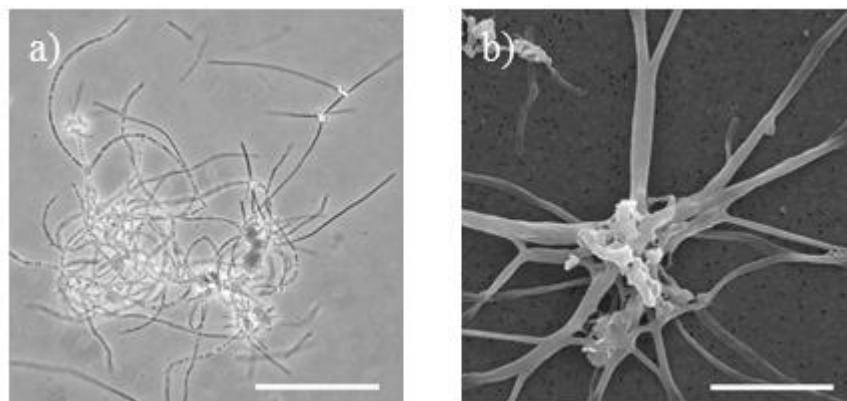
barlangban található kiválásokról, de a „hegyitej” képzésben betöltött lehetséges szerepüket nem igazolták. A rózsadombi nagy barlangok közül a Ferenc-hegyi-barlangban is megtalálhatók ezek az ásványkiválások. Itt a felső szint gömbfülkéiben és az alsó szint agyagkitöltéseinek üregében figyelhető meg a vattaszerű „hegyitej”. A mikroorganizmusok szerepét ezen kiválások esetében még nem vizsgálták (Sásdi és Virág, 2013).

3.6. Hazai termálkarsztos barlangi környezetek mikrobiológiai vizsgálata

A nemzetközi szakirodalomban számos tanulmány született a változatos geológiai környezetben (pl. barlangokban, barlangrendszerekben, mélységi karsztvíztározók vizeiben, hidegvizű forrásokban, geotermális hévforrásokban) előforduló, oligotróf kénes karsztvizes és termálvizes élőhelyek baktériumközösségeiről. Termálkarsztos környezetek mikrobiológiai vizsgálata hazánkban korábban a Villányi-hegységben, a Hévízi-tavon és a Budai Termálkarszt területén folyt.

Langyos és termál karsztvízbázisokra telepített kutak mikrobaközösségét Harkányban (Villányi-hegység) pásztázó elektronmikroszkóp, fáziskontraszt mikroszkóp, molekuláris klónozás és DGGE módszer segítségével vizsgálták (Miseta, 2012; Miseta és mtsai, 2012, 2013). A vizsgált négy kút vize (Büdöstopolca-I-es és II-es, Matty, Termál VI-os kutak) jelentős eltéréseket mutatott mind a fizikai-kémiai, mind a hidrogeológiai paraméterek tekintetében. Míg a Büdöstopolca I-es és II-es, valamint a Termál VI-os kutak vízáadó képződménye dolomitos mészköréteg, addig a Matty-kúté szürke mészkő volt. A kémiai paramétereket illetően a Büdöstopolcai kutak alacsonyabb szulfid, míg a Termál VI-os kút magasabb szulfid tartalommal volt jellemezhető. A Matty-kút kevert vizét a felszín felől érkező hideg karsztvízből és a mélyből feltörő termálvízből kapja (Miseta, 2012). A villányi szulfidban gazdag karsztutak baktériumközösségének nagy részét a 16S rRNS alapú klóntárak alapján kén-oxidáló Betaproteobacteria osztály képviselői alkották, melyekről feltételezték, hogy fontos szerepet tölthetnek be a felszín alatti karsztvizek különböző kénformáinak átalakításában, koncentrációinak szabályozásában. A kénbaktériumok mellett a vas-redukáló szervezetek (*Geobacter*, *Geothrix*, *Dechloromonas*) előfordulása is gyakori volt. A langyos vizű Büdöstopolca I-es és II-es kútban a molekuláris klónok a legnagyobb gyakorisággal az Epsilonproteobacteria osztályhoz tartozó anaerob kén-oxidáló kemolitotróf fajokkal mutattak rokoni kapcsolatot, illetve nagy arányban fordultak elő különböző mikroaerofil, kén-oxidáló kemolitotróf betaproteobaktériumok képviselői is. A Büdöstopolca

II-es kútból származó vízminta fáziskontraszt mikroszkópos felvételein *Thiothrix*-szerű fonalas baktériumokat, illetve a fonalaktól eltérő fénytörésű granulumok felhalmozódását is észlelték (Miseta és mtsai, 2012).



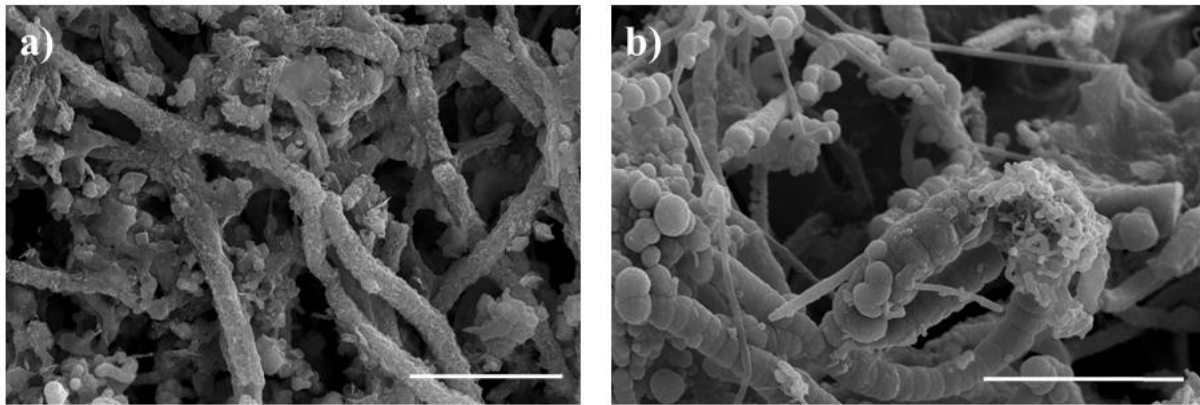
7. ábra A Harkányi Gyógyfürdő termelőkútjaiból származó vízmintákban előforduló baktériumokról készült mikroszkópos felvételek
a) A Büdöstopolca II-es kút vizének fáziskontraszt-mikroszkópos (A kép alján szereplő méretvonal 80 μm -nek felel meg) illetve b) a Matty-kút vizének SEM felvételei (vonal: 10 μm)
(Miseta és mtsai, 2012 alapján)

A 60 °C körüli kifolyó víz hőmérsékletű T6 jelzésű termálkútban legnagyobb arányban a mezofil *Sulfuritalea hydrogenivorans* fordult elő. Kisebb arányban a kén- és tioszulfát-oxidáló *Sulfurihydrogenibium subterraneum*, illetve a szulfát-redukáló *Desulfomicrobium thermophilum* (Deltaproteobacteria), Clostridia, Deferribacteres és Chlorobi filotípusok fordultak elő (7. ábra). A büdöstopolcai baktériumközösségekre jellemző kemolitotróf Beta-, Gamma- és Epsilonproteobacteria osztályok képviselői a mattyi klóntárban is megjelentek, de a többi klóntárral ellentétben itt számos heterotróf talajbaktérium is előkerült. A molekuláris klónozástól eltérően DGGE molekuláris ujjlenyomat módszerrel Gram-pozitív baktérium csoportokat is azonosítottak a szerzők. A kivágott DGGE sávok filogenetikai analízise alapján a büdöstopolcai kutakban a kemolitotróf proteobaktériumok (*Thiobacillus* és *Thiothrix* fajok), míg a Matty és T6 kutakban a *Planococcus* (Firmicutes) és a *Plantibacter*, *Microbacterium* illetve *Actinobacterium* (Actinobacteria) nemzetségek előfordulása volt jellemző (Miseta és mtsai, 2013).

A Dunántúli-középhegység egyik természetes termálvíz megcsapolódási végpontjának tekinthető Hévízi-tavon már 1954 óta folynak mikrobiológiai vizsgálatok, melyek elsősorban a tó higiéniai állapotának felmérésére irányultak. A tó átfogó, környezetmikrobiológiai vizsgálatai kb. 30 évvel ezelőtt kezdődtek, az utóbbi években pedig új generációs amplitikon szekvenálás módszerrel is vizsgálták a Hévízi-tó különleges élőhelyi sajátosságaihoz

alkalmazkodott baktériumközösségeket (Krett és mtsai, 2017). A kb 30 °C-os Hévízi-tavat két, különböző hőmérsékletű (egy 17 °C-os és egy 41 °C-os) forrás táplálja, melyek nagyban hozzájárulnak a tó egyenletes hőmérsékletének kialakulásához is. A források felső-triász korú dolomitból fakadnak. A tóvíz vertikális térbeli heterogenitását, illetve a tóvízben előforduló baktériumközösségek szezonális változásait molekuláris ujjlenyomat vizsgáló és piroszekvenálás módszerek segítségével tárták fel. A kapott eredmények alapján megállapították, hogy a tóvízben vertikális mintázat nem alakult ki, csak kisebb térbeli különbségek voltak jellemzőek, továbbá a szezonális változások a térbeli mintázati különbségeknél jelentősebbek voltak (Krett és mtsai, 2016). Mindkét alkalmazott módszerrel kimutatható volt a baktériumközösségek időbeli változása, jóllehet a két vizsgált év során a planktonikus baktériumközösség funkcionális szempontból hasonló változásokon ment keresztül. A tavaszi időszakokra a kén-oxidáló szervezetek, a nyári időszakokra az Actinobacteria és Bacteroidetes törzsekbe sorolható heterotróf szervezetek, míg az őszi időszakokra epilimnetikus előfordulású heterotróf szervezetek dominanciája volt jellemző. A vizsgált két év alatt azonban a két tavaszi időszak nagyfokú diverzitásbeli különbséget mutatott, melynek okaként a környező vizes élőhelyek vízellátásának biztosítása, illetve az őshonos növényzet visszaállítása céljából végzett partfal rekonstrukció okozta antropogén zavaró hatást jelölték meg (Krett, 2017). Piroszekvenálás módszerrel különböző eredetű forrásvizeket, biofilm és üledék mintákat is elemeztek (Krett, 2017). Az eltérő hőmérsékletű vizek jelentősen különböztek egymástól. A meleg forrásvízben legnagyobb arányban az Epsilonproteobacteria osztályhoz tartozó *Arcobacter* nemzetség (kén-oxidáló szervezetek), míg a hideg forrásvízben a Gammaproteobacteria osztályhoz tartozó *Aeromonas* nemzetség dominanciáját mutatták ki. A kevert forrásvízre a Bacteroidetes törzs, Alphaproteobacteria és Betaproteobacteria osztályok dominanciája volt jellemző. A 20 m-es mélységből származó fehér színű biofilmben főként kén oxidációban (Beta- és Gammaproteobacteria osztályok) résztvevő baktériumok voltak jelen. A tó üledékét döntő részben Chloroflexi és Cyanobacteria törzsek tagjai alkották (Krett, 2017; Krett és mtsai, 2017).

A BTK ma is aktív termálkarsztos barlangjainak (Rudas-Török-forrásbarlang és Molnár János-barlang) falán található biofilmek első összehasonlító bakteriális diverzitás vizsgálata pásztázó elektronmikroszkópia és 16S rRNS gén alapú molekuláris klónozás módszerrel történt (Borsodi és mtsai, 2012).



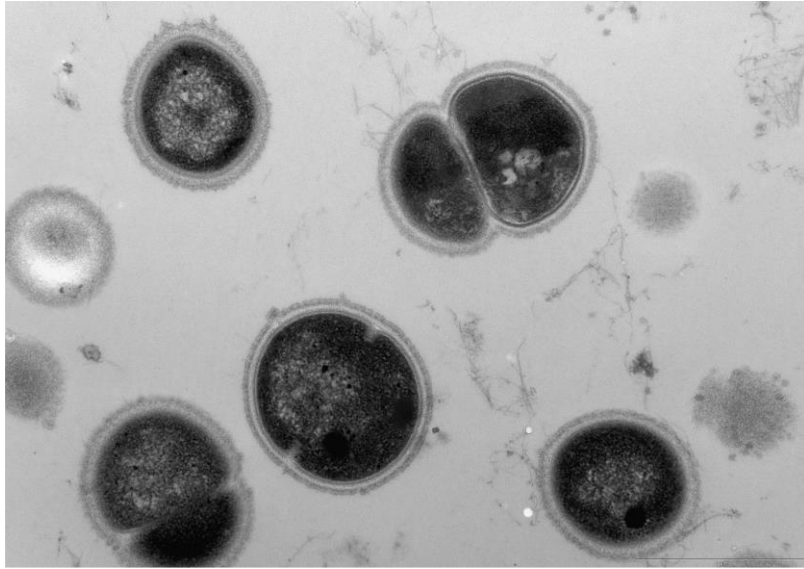
8. ábra. A 2009-es mintavétel során készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételek
a) A Molnár János-barlang biofilmjéről illetve b) a Rudas-fürdő Török forrásának biofilmjéről
készült SEM felvételek (vonal: 10 μ m) (Borsodi és mtsai, 2012 alapján)

A nagy felbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján jelentős morfológiai különbség volt kimutatható a BTK különböző mintavételi helyeiről származó biofilmek esetében (8. ábra). Míg a Molnár János-barlang biofilm mintáját hasonló nagyságú hosszú fonalas, illetve pálca alakú sejtek jellemezték (8. a ábra) többnyire homogén eloszlásban, addig a Rudas-fürdő Török-forrásának biofilmjében nagyon változatos morfológiájú sejtek voltak megtalálhatók nagy mennyiségű amorf szerves anyag mátrixba (8. b ábra) ágyazódva. A Molnár János-barlang biofilmjéből készült klóntárban a Firmicutes törzshöz tartozó aerob és anaerob, míg a Rudas-török forrásbarlang biofilmjében a Deltaproteobacteria osztályhoz tartozó kén- és szulfát-redukáló szervezetek voltak dominánsak. A Firmicutes törzs (kis GC tartalmú Gram-pozitív baktériumok) nagyarányú képviselőt karsztos barlangokban először a Molnár János-barlang esetében írták le. Aerob vas-oxidálókkal (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidimicrobium ferrooxidans*, *Ferrithrix thermotolerans*), illetve anaerob vas-redukálókkal (*Geothermobacterium ferrireducens*, *Thermolithobacter ferrireducens*) rokon szekvenciák jelenlétét is igazolták. A molekuláris klónokkal legközelebbi rokonságban lévő fajok anyagcsere tulajdonságai alapján feltételezték, hogy a biofilmekben előforduló baktériumközösségek tagjai mindkét mintavételi helyen részt vehetnek a kén- és vas-ciklusokban (Borsodi és mtsai, 2012).

A BTK-ban található források biofilmjei rádium rezervoárként a források radon tartalmáért is felelősek, így a radioaktivitásuknak, illetve a nyomelem-tartalmuknak köszönhetően extrém környezetet jelentenek a mikroorganizmusok számára (Erőss és mtsai, 2012; Kuzmann és mtsai, 2014). Egyik kutatásunk során a radioaktív sugárzásnak ellenálló baktériumközösségeket tenyésztési eljárással a minták besugároztatását követően tanulmányoztuk. Mivel Magyarországon a legmagasabb radontartalom a BTK területén, a

Diana-Hygieia- és a Rudas-Török forrásbarlangok esetében mérhető, így vizsgálataink helyszínéről is e két forrást választottuk.

A forrásbarlangokban található vöröses-barnás biofilm, illetve a víz felszínén található kalcitlemez mintákat NORATOM készülékkel (5, 10 és 15 kGy) γ -sugárzással kezeltük. Különböző táptalajok felhasználásával összesen közel 400 pigmentált és/vagy endospóra képző baktériumot vontunk tenyésztésbe a két mintavételi helyről. A kezeletlen és a besugárzott mintákból izolált baktériumtörzseket a 16S rRNS gén bázissorrend elemzése alapján a Proteobacteria, a Firmicutes, a Deinococcus-Thermus és az Actinobacteria törzsek képviselőiként detektáltuk. A legnagyobb arányban szinte minden mintában a Firmicutes és az Actinobacteria törzsek Gram-pozitív baktériumcsoportjai kerültek elő. A 15 kGy-el (néhány percig tartó 10 Gy-es besugárzás a legtöbb gerincesnél, beleértve az embert is halálos kimenetelű) kezelt mintákból a *Bacillus*, a *Micrococcus*, a *Paracoccus*, a *Deinococcus* és a *Brevibacterium* nemzetségek képviselőit mutattuk ki. A vizsgálatok során több olyan baktériumtörzset is sikerült tenyésztésbe vonni, melyeket korábban sem molekuláris klónozás, sem pedig tenyésztésen alapuló módszerekkel nem lehetett kimutatni a BTK forrásaiból (Anda és mtsai, 2014; 2017; Borsodi és mtsai, 2012). Az előzetes feltételezések ellenére bizonyos esetekben nagyobb taxonómiai diverzitást tártunk fel a besugárzott minták esetében, mint a kezeletlen mintáknál. Mindezek alapján feltételezhető, hogy a besugárzást követően a lassan növekvő, kevésbé versenyképes, de a sugárzásnak ellenálló vagy a természetes élőhelyükön nyugvó állapotban lévő mikrobákat is tenyésztésbe tudtuk vonni. Az izolátumok nagy részére Gram-pozitív sejtfálszerkezet, illetve 65 mol% feletti GC-tartalmú genom volt jellemző, ami azt sugallja, hogy ezen jellemzők alapvető jelentőségűek lehetnek a sugárrezisztencia mechanizmusában. A besugárzott fajok jó részére jellemző volt, hogy korábban is előkerültek nagy radioaktív sugárzásnak kitett környezetekből, ilyenek pl. az endospórát képző *Bacillusok* (Pál, 2015; Enyedi, 2016; Enyedi és mtsai, 2019).



9. ábra. Az új fajként leírt *Deinococcus budaensis* ultrastruktúrája transzmissziós elektronmikroszkópos kép alapján. Mérték 1 μm (Makk és mtsai, 2016)

Az egyik 15 kGy-el kezelt sugárrezisztens izolátumot (FeSTC15-38) a polifázikus taxonómiai elvek figyelembevételével a tudományra nézve új fajként, *Deinococcus budaensis* (9. ábra) néven írtuk le (Makk és mtsai, 2016).

4. Célkitűzések

Fővárosunk területe alatt jelentős kiterjedésű, hálózatos barlangrendszerek találhatók, amelyek sajátos hidrogeológiai helyzete azokat világviszonylatban is különlegessé teszi. A hipogén karsztok körébe sorolható Budai Termálkarszt (BTK) területén végzett hidrogeológiai vizsgálatok szerint a Rózsadomb területén az eltérő eredetű, kémiai összetételű és hőmérsékletű vizek keveredése oldotta ki a barlangokat. A Gellért-hegy kisebb üregeiben ez a hatás nem tud érvényesülni, itt közel azonos hőmérsékletű és kémiai összetételű források fakadnak, ezért feltételezhető, hogy az üregek oldódása itt mikroorganizmusok segítségével zajlik. A különböző megcsapolódási típusokhoz kapcsolódó biofilmeket alkotó prokarióta közösségek morfológiai tulajdonságairól, közösség szerkezetéről, illetve a hipogén karsztosodási folyamatokban résztvevő baktériumközösségek összetételének változásáról és a biofilmek képződési folyamatáról meglehetősen kevés ismerettel rendelkezünk.

Jelen kutatás során ezek figyelembevételével az alábbi célokat tűztük ki:

- a BTK területén a különböző megcsapolódási típusokhoz kapcsolódó biofilmek morfológiai tulajdonságainak megismerése és összehasonlítása;
- a BTK területén található források, forrásbarlangok víz, biofilm, kalcit és üledék közösség szerkezetének feltárása molekuláris klónozásos és új generációs szekvenálási módszerek segítségével;
- a BTK területén egy terepi kísérleti modellrendszer kiépítése a hipogén karsztosodási folyamatokban résztvevő biofilm baktériumközösségek képződésének tanulmányozása, a biofilmben végbemenő szerkezeti és összetételbeli változások nyomonkövetése céljából egyidejűleg a környezet fiziko-kémiai állapotának folyamatos monitorozásával;
- a BTK északi és déli rendszeréhez tartozó barlangok és forrásbarlangok baktériumközösségeinek részletes összehasonlító elemzése.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Mintavételi helyek bemutatása és mintavétel

Az elmúlt években, 2012 és 2016 között, az 1. táblázatban felsorolt mintavételi helyeken és időpontokban végeztünk mintavételezést, melynek során biofilm-, víz- és üledékmintákat gyűjtöttünk összesen hat mintavételi helyről.

1. táblázat. A Budai Termálkarsztban gyűjtött minták a mintavételi helyek és időpontok szerint

Mintavételi hely	Mintavételi időpontok	Minta típus	Minta jelzése	Vizsgálatok		
				K	P	S
Északi rendszer						
Molnár János-barlang	2012. december	biofilm	MJBB/MJBA	+		+
		kevert víz	MJWB	+		
	2014. január	biofilm	MJB		+	+
		hideg víz	MJC		+	
		kevert víz	MJM		+	
		meleg víz	MJW		+	
		üledék	MJS		+	
Városligeti kút	2012. december	biofilm	VLBB/VLBA	+		+
		víz	VLWB	+		
Déli rendszer						
Gellért Ösforrás	2012. december	biofilm	GOBB/GOBA	+		+
Diana-Hygieia-forrásbarlang	2012. december	biofilm	DHBB/DHBA	+		+
		víz	DHWB	+		
	2015. október	biofilm	DHB		+	+
		üledék	DHS		+	
Rudas-Török-forrásbarlang	2012. december	biofilm	RTBB/RTBA	+		+
		víz	RTWB	+		
	2014. november	biofilm	RTB		+	+
	2014. november	kalcit	RTC		+	
	2015. október	víz	RTW		+	
	2015. október- 2016. október	biofilm minták (tárgylemezen)	3,6,9,12,15, 18,21, 24, 27, 30, 1 év		+	+
Rác-fürdő Nagy-forrás	2012. december	biofilm	RNBB/RNBA	+		+

Jelmagyarázat: **K**: molekuláris klónozás; **P**: pirosekvenálás; **S**: pásztázó elelektronmikroszkópos vizsgálatok

5.1.1. Mintavételek a Molnár János-barlangból

A mikrobiológiai vizsgálatokhoz a Molnár János-barlangból (É.sz. 47.518; K.h. 19.036) először 2012 decemberében történt mintavétel (10. ábra). A barlang oldalfalán képződött barna biofilmből, illetve a barlangot kitöltő termálvízből steril spatulák és steril, zárható üvegpalack segítségével vettünk mintákat Spanyol József bűvár segítségével. 2014

januárjában ismételten lehetőségünk volt mintákat (különböző víz, biofilm, illetve üledék) gyűjteni a barlangból Balázs Gergely búvár közreműködésével. A különböző vízminták (hideg, kevert és meleg víz) gyűjtését azért tartottuk szükségesnek, mert a nagyrészt termálvízzel kitöltött rózsadombi megcsapolódási rendszerhez tartozó Molnár János-barlang vizét a mélyből feltörő meleg, valamint a Budai hegyek felől áramló hideg karsztvízből is kapja. A víz hőmérsékletét így a kétféle víz keveredésének mértéke határozza meg, ami a víztükör közelében 23-26 °C-os, 25-35 méteres mélységben pedig ~19 °C (Eröss és mtsai, 2008).



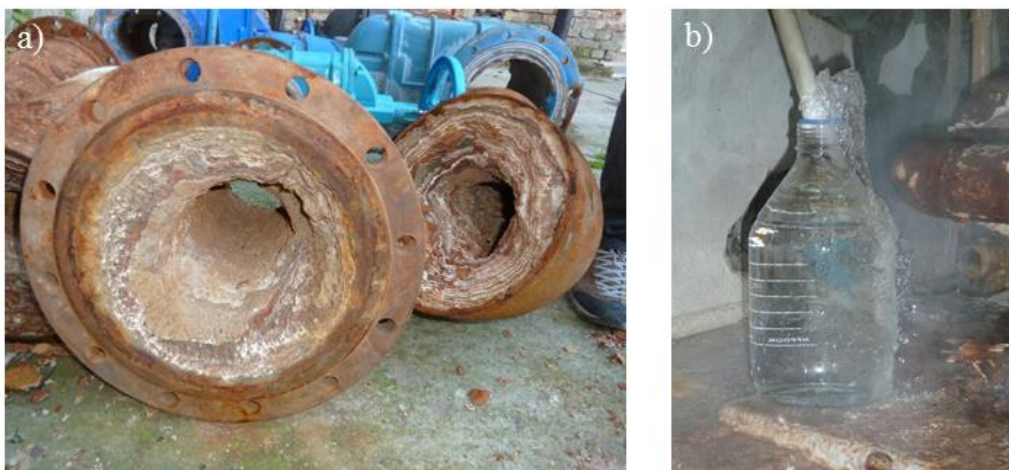
10. ábra. a) A Molnár János-barlang járatrendszere

(A képet a http://fovarosi.blog.hu/2008/12/04/a_molnar_janos_barlang oldalról töltöttem le.)

b) A Molnár János-barlangból 2012 decemberében gyűjtött barnás-vöröses színű biofilm minta, steril jól zárható üvegben a barlang kevert vizével feltöltve

5.1.2. Mintavétel a városligeti VL-II kútból

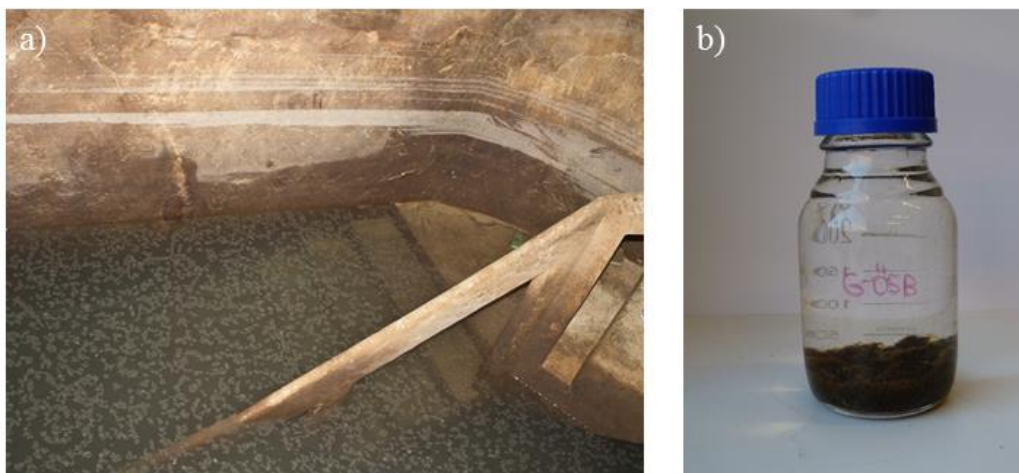
A városligeti Széchenyi-fürdőt ellátó VL-II kút (É.sz. 47.518, K.h. 19.084) vízvezeték csövének falán megtelepedett biofilmből és a termálforrás 74 °C-os vizéből 2012 decemberében vettünk mintákat (11. ábra). A Széchenyi-fürdő vízellátását ez az 1938-ban üzembe helyezett kút biztosítja. A víz a Dachsteini Mészke víztartóból 1256 m mélyről érkezik (Alföldi és mtsai, 1968). Mintavételre a vízvezeték cső 2012-es szétszerelése miatt csak ekkor volt lehetőségünk.



**11. ábra. a) A Városligeti Széchenyi-fürdőt ellátó kút vízvezeték csöve
b) A Széchenyi-fürdőt ellátó kútból való mintavétel pillanata**

5.1.3. Mintavétel a Gellért Ősforrásból

A Szabadság-híd budai hídfője alatt húzódó Gellért Ősforrás (É.sz. 47.483, K.h. 19.050) vize egy vasbeton medencébe gyűlik össze (12. a ábra). A forrás vizét csak az 1800-as évek végéig használta a fürdő, ma már csak a Gellért-fürdő tartalék vízbázisául szolgál. A forrás betonmedencéjének oldalfalán barnás-vöröses biofilm figyelhető meg, a vízfelületén kalcit lemezkék. Az Ősforrás hasadékbarangjából 2012 decemberében vettünk biofilm mintát (12. b ábra) Leél-Őssy Szabolcs és Szilágyi Zsolt bűvár segítségével. Mivel a forrás vizét a fürdő nem használja, így vízmintát 2012 decemberében a Gellért Ősforrásból nem vettünk.



**12. ábra. a) A Gellért Ősforrás betonmedencéje
b) Barnás-vöröses biofilm minta steril, jól zárható üvegben a forrás vizével feltöltve**

5.1.4. Mintavételek a Diana-Hygieia-forrásbarlangból

A forrásrendszer vize a fürdő úszócsarnokának alapozási munkálatai során feltárt Diana- és a Hygieia-forrásokból (É.sz. 47.489, K.h. 19.047) származik. A víz a dolomitból szivárog és így jut a közös gyűjtőmedencébe. A medence alját kaviccsal kevert dolomitliszt borítja, kibetonozott falán barnás-vöröses biofilm található, míg a víz felszínét fehér színű kalcitlemezek fedik (Mádl-Szőnyi, 2013). A forrásrendszert a Rudas-fürdő üzemterületén található aknán keresztül lehet megközelíteni. A mikrobiológiai vizsgálatokhoz a mintavétel 2012 decemberében történt első ízben a forrásrendszerben képződött biofilmből és vízből szintén Szilágyi Zsolt búvár segítségével (13. ábra). 2015-ben Balázs Gergely segítségével ismételten vettünk biofilm, kalcit, illetve üledék mintákat, annak érdekében, hogy immáron új generációs szekvenálás módszer segítségével elemezhessük a mintákat.

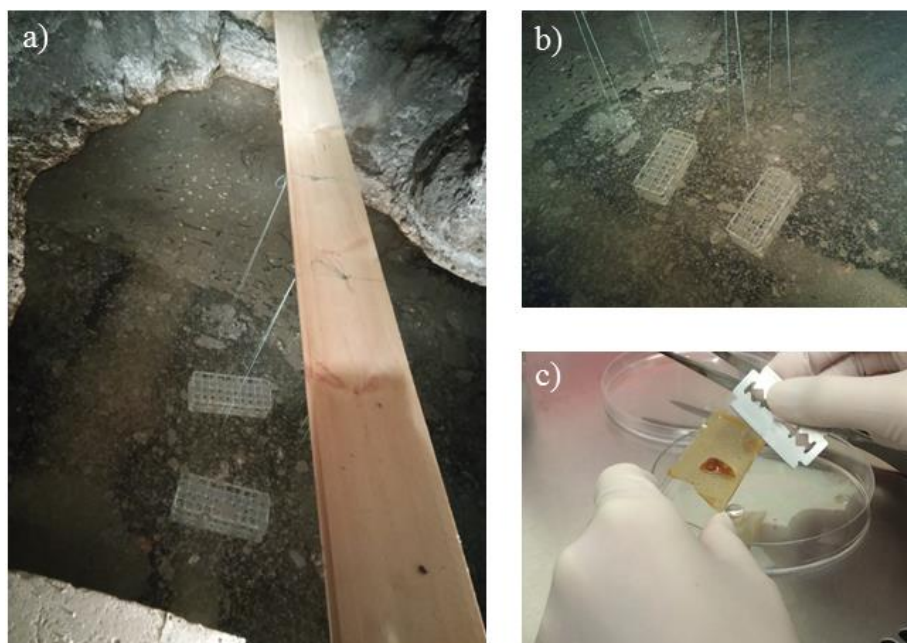


**13. ábra. a) Az aknán lemerülő Szilágyi Zsolt búvár a 2012-es mintavétel során
b) A Diana-Hygieia-forrásrendszer egyik járata
c) Barnás-vöröses biofilm minta, steril, jól zárható üvegben, a forrás vizével feltöltve
a 2012-es mintavételből**

5.1.5. Mintavételek a Rudas-Török forrásbarlangból

A Rudas-fürdő Török-forrásánál (É.sz. 47.489, K.h. 19.047) először 2012 decemberében vettünk víz és biofilm mintát, melyet molekuláris klónozás módszerével vizsgáltunk. Ezt követően 2014-ben volt lehetőségünk újra biofilm és vízfelszíni kalcitlemez mintákat venni részletes új generációs szekvenálással való elemzéshez.

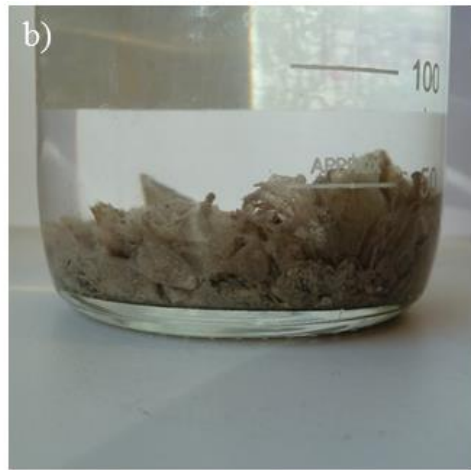
A hipogén karsztosodási folyamatokban résztvevő baktériumközösségek összetételének változását és a biofilmek képződési folyamatának tanulmányozását egy modellrendszer segítségével végeztük. A kísérlet megvalósítására könnyű megközelíthetősége, stabil, zavarásmentes környezete miatt a Rudas-fürdő Török-forrásának medencéjét jelöltük ki (14. ábra). Az itt található kb. 0,5 m mély forrásmedence fölé egy falécezt helyeztünk ki, melyre damil segítségével fertőtlenített műanyag kémcsőállványokat rögzítettünk a víz felszínétől kb. 20 cm mélységben, melyekbe steril tárgylemezeket helyeztünk a biofilm képződéséhez. A biofilm fejlődését és a fizikai-kémiai paraméterek változását 30 héten keresztül (2015. szeptember és 2016. április között) 3 heti rendszerességgel végzett mintavételezést követően vizsgáltuk, majd 2016. októberében az egy év alatt fejlődött biofilmből is mintát vettünk.



**14. ábra. a) A Rudas-Török forrásbarlangba kihelyezett kísérleti modellrendszer
b) A falécre helyezett kémcsőállványok, bennük a tárgylemezekkel
c) A tárgylemezen fejlődött egy éves biofilm eltávolítása steril borotvapenge segítségével**

5.1.6. Mintavétel a Rác-fürdő Nagy-forrásából

A Rác-fürdő Nagy-forrása (É.sz. 47.490, K.h. 19.043) a fürdő DK-i szárnyán egy márgába vájt, 35 m hosszú és 3-6,5 m széles táróban csapolódik meg (Mádl-Szőnyi, 2013). A forrásból 2012 decemberében vettünk biofilm mintát Szilágyi Zsolt segítségével (15. ábra). Mivel a Rác-fürdő forrása nem üzemel, ezért vízmintát 2012 decemberében nem vettünk.



15. ábra. a) A Rác-fürdő Nagy-forrás aknájának lejárata
b) A Rác-fürdő Nagy-forrásából vett biofilm minta, steril, jól zárható üvegben, a forrás vizével feltöltve

5.2. A termálvizek fizikai és kémiai paramétereinek vizsgálata

A dolgozatban szereplő vizsgálatba vont valamennyi vízminta fizikai és kémiai paraméterének vizsgálatát a 2015. évi Rudas-fürdő Török-forrásban végzett modellkísérlet kivételével Dr. Jurecska Laura végezte. Az egyes paraméterek meghatározása minden esetben az Anda és munkatársai (2015) cikkében leírtaknak megfelelően történt.

A 2015. szeptemberben kezdődő Rudas-Török-forrásbarlangban folyó biofilm fejlődésére irányuló *in situ* kísérletben 2016. májusáig 30 héten keresztül, kezdetben hetente, majd három hetente Bodor Petrával együtt a helyszínen mértük a medencevíz pH, hőmérséklet, fajlagos elektromos vezetőképesség és oldott oxigén (dissolved oxygen, DO) értékét WTW MultiLine P 8211 multiméter segítségével. A kísérlet kezdetekor DATAQUA nevű műszert is kihelyeztünk a forrásbarlang vizébe, mely egy évig folyamatosan monitorozta a vízszint, a hőmérséklet, illetve a fajlagos elektromos vezetőképesség adatokat.

5.3. A minták mikroszkópos vizsgálata

A pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) végzett vizsgálatok során a BTK különböző barlangjaiból és forrásbarlangjaiból származó mintákat 3 órán keresztül 5%-os glutáraldehydben (1 M Na-K foszfát puffer, \sim pH=7) fixáltuk 0,2 μ m-es pórus átmérőjű polikarbonát Millipore szűrőlapok között. A tárgylemezeken kialakuló biofilmek esetében kb. 1 x 1 cm² nagyságú négyzeteket vágunk ki üvegvágó kés segítségével és ezt helyeztük glutáraldehyd oldatba. A következő mosási lépések során kétszer, 10 percre foszfát-pufferbe

helyeztük a preparátumokat (0,1 M Na-K foszfát puffer, ~ pH=7). A filtereket, illetve a kis tárgylemez kockákat Eppendorf-csövekben fagyasztottuk le (-95 °C), majd ezt követően a mintákat liofilizáló készülékbe (Edwards) helyeztük (2×10^{-2} mbar, -60°C) és 5-10 órán keresztül szárítottuk. Az eljárás során a lefagyasztott mintákból a jeget vákuumban elszublimáltattuk. A vizsgálat előtt közvetlenül a kiszáritott mintákat vékony aranyfilmmel vontuk be, és EVO MA 10 Zeiss mikroszkópban figyeltük meg az MTA Ökológiai Kutatóközpontjának Duna-kutató Intézetében. A minták másik részénél a kiszáritott mintákat szénnel gőzöltük be. Az így előkészített mintákat ez esetben FEI Quanta 3D kétsugaras elektronmikroszkópban (FIB-SEM) visszaszórt elektronos (BSED detektor) és szekunder elektronos (ETD detektor) üzemmódban elemeztük az ELTE Természettudományi Karán.

Elektronmikroszkópos felvételek a 2012 decemberi mintavételkor a MJB, VLB, GOB, DHB, RTB, RNB, a 2014 novemberi mintavétel esetében a RTB, a 2015. októberi mintavételkor a DHB illetve a 2015 október-2016 októberéig tartó mintavételek során gyűjtött 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 és 1 év jelzésű biofilm mintákról készültek.

5.4. Mintaelőkészítés és a közösségi DNS kinyerése

A mintákat a 24 órán belül történt laboratóriumi feldolgozásig minden esetben 6-8 °C-on hűtve tároltuk.

A BTK különböző forrásainak, forrásbarlangjainak vízmintáiból 1-1 litert szűrtünk át 0,22 µm pórusméretű cellulóz nitrát szűrőn (Millipore, Billerica, MA, USA) vákumpumpa segítségével. A DNS kivonást megelőzően a biofilm, az üledék, illetve a kalcit mintákat 10 000 rcf értéken 2 percig centrifugáltuk. A felülúszó eltávolítása után kapott tömörített mintákból 0,2 g-nyi mennyiséget használtunk a DNS izoláláshoz.

A Rudas-Török forrásrendszerben kihelyezett modellrendszer esetében a hétről hétre fejlődő biofilmeket steril borotvapengével távolítottuk el a tárgylemezekről.

A közösségi DNS kinyerését Ultra Clean Soil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, USA) felhasználásával a gyártó utasításainak megfelelően végeztük azzal az eltéréssel, hogy a sejtfeltáráshoz sejtmalom (Mixer Mill MM301, Retsch, Haan) segítségével (2 percig való rázatás 30 Hz-en) került sor. A kivont közösségi DNS-t a további felhasználásig -20 °C-on tároltuk.

5.5. Molekuláris klónozáson alapuló közösségszerkezeti vizsgálatok

A közösségi DNS kivonása után kék-fehér szelekción alapuló módszerrel (Sambrook és Russell, 2001) hoztunk létre klóntárakat. A bakteriális riboszóma kis alegységében található 16S rRNS-t kódoló gén egy szakaszát Bacteria specifikus 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') (Lane, 1991) illetve Archaea specifikus A109f (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3'), A958r (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3') primerekkel (Baker és mtsai, 2003) polimeráz láncreakció (PCR) során sokszoroztuk fel. A reakció során alkalmazott *Taq* DNS polimeráz túlnyúló adenin nukleotidokat tesz az ampikonokra terminális transzferáz aktivitása révén, így a PCR termékek alkalmassá válnak a TA-klónozó vektorokba történő ligálásra. A PCR termékeket tisztítás után (PCR-M kit, Viogene) klónozó vektorba ligáltuk (pGEM®T Vector System, Promega) a gyártó útmutatásait követve. A ligáló premix összetétele mintánként a következő volt: 2 x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA ligase: 5 µl, pGEM®T Vector (50 ng): 1 µl, T4 DNA ligase (3 Weiss units/ µl): 1 µl, templát DNS: 2 µl.

A ligálás után a PCR termékeket 4°C-on 24 órán át inkubáltuk, majd *E. coli* JM109 sejtekbe transzformáltuk. A PCR csövek tartalmát (2-2 µl), illetve a kompetens sejteket 5 percig jégre tettük, ebből 50 µl-t a ligálást tartalmazó csövekbe mértünk, majd ezt is jégre tettük 20 percig. Ezután következett a 45 másodpercnyi hősokk 42 °C-os vízfürdőben, majd ismét jégre tettük a mintákat 2 percig. A csövekbe 950 µl SOC (Super Optimal Broth) médiumot pipettáztunk, majd 37 °C-on 1,5 óráig inkubáltuk. Ezt követően 100 µl-nyi mennyiséget szélesztettünk LB tápagarra, ami X-gal-lal (5-bróm-4-klór-3-indol-béta-D-galakto-piranozid) és IPTG-vel (izopropil-béta-D-tio-galakto-piranozid) kezelt ampicillint tartalmazott. Ezt is 37 °C-os inkubáció követte 24 órán át. A továbbiakban azokat a telepeket használtuk, melyek vektorral transzformáltak voltak, tehát ampicillin tartalmú táptalajon növekedtek és az inzert DNS-t tartalmazták, így X-gal jelenlétében fehér színűek voltak. A fehér telepeket steril fogpiszkálóval átpontoztuk LB (Luria-Bertani) tápagarra, és ismét 24 órán át inkubáltuk. A klónokat tartalmazó telepek feltárása 30-30 µl HPLC tisztaságú vízben történt, 5 perces, 98 °C-os inkubálással 96 lyukú mikrotiter lemezen (PCR plate). A lemezeket 3 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk a sejttörmelékek kiülepítésének céljából. A klóntárakat a feldolgozásig -20 °C-on tároltuk. Az inzert szekvencia kinyerése céljából a DNS izolátumokból két PCR-t végeztünk. Az első PCR-t M13 primerekkel (M13f: 5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3' és M13r: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'; Eurogentec) végeztük

(vektorra specifikus), míg a nested PCR-t 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 1492r (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT -3') illetve A109f (5'-ACK GCT CAG TAA CAC GT-3'), A958r (5'-YCC GGC GTT GAM TCC AAT T-3') primerekkel (Sambrook és Russell, 2001; Lane, 1991; Baker és mtsai, 2003).

A PCR premix összetétele az alábbiak szerint alakult 25 µl térfogat/minta esetén:

PCR Puffer	2,5 µl
MgCl ₂	2,0 µl
dNTP	5,0 µl
Forward primer	0,25 µl
Reverz primer	0,25 µl
dH ₂ O	14,0 µl
<i>Taq</i> polimeráz	0,5 µl
DNS templát	0,5 µl

A PCR-hez felhasznált reagensek a következők voltak: 10 x *Taq* puffer (Fermentas, Vilnius, Litvánia) (200 mM TRIS/HCl, 15 mM MgSO₄, 100 mM (NH₄)₂SO₄), MgCl₂ oldat (Fermentas, Vilnius, Litvánia) (25 mM), dNTP keverék (Fermentas, Vilnius, Litvánia) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP), forward primer (3,25 x 10⁻⁵M), reverz primer (3,25 x 10⁻⁵M), desztillált víz (RN-áz, DN-áz mentes DEPC (dietil-pirokarbonát) kezelt, steril), *Taq* DNA Polymerase (recombinant) (Fermentas, Vilnius, Litvánia).

A PCR során az alábbi hőprofil alkalmaztunk a Bacteria klóntárak esetében (32 ciklus):

Kezdeti denaturáció	95 °C	5 perc
Denaturáció	94 °C	30 másodperc
Anneláció	52 °C	30 másodperc
Extenzió	72 °C	1 perc
Végső extenzió	72 °C	10 perc
Hűtés	4 °C	

A „touchdown” PCR során az alábbi hőprofil alkalmaztuk az Archaea klóntárak esetében:

Kezdeti denaturáció	98 °C	3 perc	
Denaturáció	94 °C	30 másodperc	
Anneláció	60 °C	30 másodperc	20 ciklus
Elongáció	72 °C	90 másodperc	
Denaturáció	94 °C	30 másodperc	
Anneláció	50 °C	30 másodperc	15 ciklus
Elongáció	72 °C	90 másodperc	
Végső extenzió	72 °C	30 perc	
Hűtés	4 °C		

A PCR termékek jelenlétét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. Először 1%-os agaróz gél (80 ml 1 x TBE (Tris-Bórsav-EDTA) puffer, valamint 0,80 g agaróz) készítettünk, amelybe DNS-be interkalálódó festéket (ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution (Pacific Image Electronics)) tettünk. 3 µl töltőpuffert (30% (v/v) glicerin, 0,25 mM brómfenolkék) szuszpendáltunk fel 5 µl DNS mintával, majd a már szilárd gél zsebeibe töltöttük. A legelső zsebbe 3 µl hármas jelzésű (Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker 3 (Fermentas, Vilnius, Litvánia)) molekulásúly markert mértünk, így a DNS hossza megbecsülhetővé vált. A gél 1 x TBE (tris-bórsav-EDTA) pufferben 20 percig 100 mV-on futtattuk. A csíkok detektálását UV fényben végeztük, mivel az interkalálódó festék a DNS molekula nagy árkába kötődve így válik láthatóvá.

Ezt követően a termékek ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) mintázatainak vizsgálata következett (Vaneechoutte és mtsai, 1992). A felszaporított 16S rRNS szakaszokat *MspI* és *BsuRI* restriktációs endonukleáz enzimekkel hasítottuk.

Az ARDRA premix összetétele az alábbiak szerint (minta/enzim) alakult:

Puffer	2,5 µl
dH ₂ O	7,76 µl
Enzim	0,24 µl
Templát	10,0 µl

A hasításhoz felhasznált reagensek: *MspI* (*HpaII*) (Fermentas, Vilnius, Litvánia), *BsuRI* (*HaeIII*) (Fermentas, Vilnius, Litvánia), 10 X Buffer Tango BSA-val (Fermentas, Vilnius, Litvánia), 10 X Buffer R BSA-val (Fermentas, Vilnius, Litvánia), desztillált víz (RN-áz, DN-áz mentes DEPC kezelt, steril).

A premixet PCR csövekbe mértük szét, melybe a PCR termékek is belekerültek, ezt vortexeltük és a mintákat 3 órán keresztül 37 °C-os vízfürdőben inkubáltuk. Az emésztett DNS termékek detektálását agaróz gélelektroforézissel végeztük. 2%-os agaróz gél használtunk, melybe itt is interkalálódó festéket tettünk. A 25 µl-es PCR termékekhez 5 µl töltőpuffert mértünk, és ezt töltöttük a szilárd gél zsebeibe. A középső zsebekbe 5 µl 100-as jelzésű molekulásúly markert (GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas, Vilnius, Litvánia)) tettünk. A gél futtatása 1 x TBE oldatban 80 mV-on 80 percig történt. A DNS szakaszok detektálását UV fényben végeztük el, majd az eredményekről fényképet készítettünk.

Az eltérő hasítási mintázattal rendelkező ARDRA csoportokat CoreIDRAW szoftver felhasználásával manuálisan választottuk szét egymástól. Azon molekuláris klónok PCR termékét, melyek egyedi hasítási mintázattal rendelkeztek EZ-10 Spin Column PCR Products

Purification Kit (Bio Basic Inc.) segítségével megtisztítottuk a gyártó utasításait követve. A tisztított PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel azonosítottuk.

A szekvenáló reakciót az LGC Genomics (Berlin, Németország) végezte Sanger-féle láncterminációs módszerrel. A kromatogramok manuális korrigálását a Chromas program (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Ausztrália), míg a szekvenciák filogenetikai csoportosítását az EzTaxon (Kim és mtsai, 2012) és az NCBI internetes adatbázisok segítségével végeztük. A filogenetikai analízist a Mega 7.0 szoftverrel készítettük (Kumar és mtsai, 2016).

A klónszekvenciákat a GenBank adatbázisban a következő azonosítók LN998831-LN998895, LN998927-LN998931, LN998932-LN998939, LN998948-LN998960 (Molnár János-barlang), LN794665-LN794744 (Városligeti artézi kút), LN680153-LN680225, LN864935-LN864948 (Gellért Ősforrás), LN680106-LN680152, HG974481-HG974492, LN864926-LN864934 (Diana-Hygieia-forrásbarlang), LK936198-LK936243, LN864963-LN864971, LT985982 (Rudas-Török-forrásbarlang), LN680226-LN680256, LN864949-LN864962 (Rác-fürdő Nagy-forrás) alatt tettük közre.

5.6. Piroszekvenáláson alapuló közösségszerkezeti vizsgálatok

A piroszekvenálás és más új generációs genomszekvenálási technikák megjelenésének köszönhetően a különféle környezetekben előforduló prokarióta közösségek sokkal nagyobb felbontásban, olcsóbban és kevésbé munkaigényesen tanulmányozhatók. A piroszekvenálás során az általunk választott gén pár száz bázispár hosszú szakaszát előzetesen hagyományos PCR-rel amplifikáltuk, majd a kapott amplikonokat egy emulziós keverékben zajló PCR reakció során szilárd gyöngyökhöz kötöttük, és a gyöngyök felszínén felszaporítottuk. Ideális amplikon-gyöngy arány esetén egy emulzió cseppben egy gyöngyhez egyféle (klonális) DNS molekula került, amelynek felsokszorozására a szekvenálási reakcióban a kellő jelerősség elérése miatt volt szükség. A DNS molekulákat nem tartalmazó gyöngyöket később eltisztítottuk az oldatból. Az így kapott amplikontárakat különféle enzimekkel együtt a szekvenáló chipre vittük, ahol a rámosási és centrifugálási lépések során egy gyöngy egy reakciótérbe került bele a többszázer reakciótérrel tartalmazó mikrochipen. A nukleotid sorrend detektálása a gyöngyökön lévő immobilizált DNS komplementer bázisainak beépülésével történt, ciklusosan más és más dNTP-k hozzáadása során. A beépülő komplementer bázis mellett a dNTP-ből felszabaduló pirofoszfátot az ATP-szulfuriláz enzim

adenozin-foszfoszulfát jelenlétében ATP-vé alakította, majd ezt a luciferáz enzim fényjellé. A be nem épült nukleotidokat és a fel nem használt ATP molekulákat az apiráz enzim bontotta el. Egy nagyfelbontású kamera detektálta a különféle rámosási ciklusokban felvillanó fényjeleket, amelyekből egy szoftver rakta össze az eredeti DNS bázisrendeket (Jones, 2015; Schuster, 2007; Busato és Tost, 2015). Ezt követően a bioinformatikai adatelemzésben megfelelően szűrt több ezer leolvasás végső soron nagy részletességgel tárta elénk a közösségalkotó taxonokat.

A 2014 és 2016 között vett különböző biofilm, üledék, kalcit valamint vízminták közösségalkotóinak bázisrend meghatározásához a 16S rRNS gén egy szakaszát szaporítottuk fel polimeráz láncreakció segítségével B341F (5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG - 3') és B785R (5' - GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC - 3') primerekkel (Klindworth és mtsai, 2013). A piroszekvenálás során fúziós primereket (5' – Adapter B (CCT ATC CCC TGT GTG CCT TGG CAG TCT CAG) – forward primer (CCT ACG GGN GGC WGC AG) – 3' illetve 5' – Adapter A (CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG AC) – könyvtár azonosító (library key) (TCAG) – mintaazonosító (barcode vagy mid) (7 nukleotid, melyek mintánként legalább 2 nukleotid pozícióban különböznek) – reverse primer (GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC) – 3') használtunk (Szabó és mtsai, 2017).

A PCR-hez felhasznált reagensek a következők voltak: 1x HF *Phusion* puffer (Thermo Fisher Scientific), dNTP keverék (Fermentas, Vilnius, Litvánia) (1 mM dATP, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP), forward és reverz primerek, desztillált víz (RN-áz, DN-áz mentes DEPC (dietyl-pirokarbonát) kezelt, steril), szarvasmarha szérum albumin (BSA) (Fermentas, Vilnius, Litvánia), nagy másolási hűségű *Phusion* Hot Start II DNS Polimeráz (2 U/μl, Fermentas, Vilnius, Litvánia). A PCR-t mintánként három párhuzamosban végeztük, így összesen 3 x 20 μl térfogatban a sztochasztikus hatások megnyilvánulásának csökkentése érdekében.

A PCR premix összetétele az alábbiak szerint alakult 20 μl térfogat/minta esetén:

5 x HF <i>Phusion</i> Puffer	4,0 μl
dNTP	4,0 μl
B341F	0,5 μl
B785R	0,5 μl
dH ₂ O	9,4 μl
BSA	0,4 μl
<i>Phusion</i> Polimeráz	0,2 μl
DNS templát	1,0 μl

A PCR során az alábbi hőprofilt alkalmaztuk (25 ciklus):

Kezdeti denaturáció	98 °C	5 perc
Denaturáció	95 °C	40 másodperc
Anneláció	55 °C	2 perc
Extenzió	72 °C	1 perc
Végső extenzió	72 °C	10 perc
Hűtés	4 °C	

A reakció sikerességét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük az 5.5. fejezetben leírtak szerint, majd az azonos mintákhoz tartozó PCR termékeket egy PCR csőbe gyűjtöttük össze. Ezt követően a PCR termékeket High Pure PCR Cleanup Kit (Roche /454 Life Sciences, Branford, CT, USA) segítségével tisztítottuk meg a gyártó útmutatása szerint. Az amplikontárak tisztaságának ellenőrzése és koncentrációjuk meghatározása High Sensitivity DNA Kit-tel (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) történt 2100 Bioanalyzer (Agilent) készüléken (Szabó és mtsai, 2017). A műszer a DNS templát hosszúságát, illetve koncentrációját becsüli meg a chipen. Az emulziós PCR, az emulzió tisztítása, illetve a piroszekvenálás Roche GS Junior platformon történt a gyártó által megadott Lib-L protokollt követve (2012. márciusi verzió, Roche/454 Life Sciences).

A PCR amplifikáció és a szekvenáló reakció során keletkezett műtermékeket (kimérák, homopolimerek) és az egyszer előforduló (singleton) szekvenciákat a bioinformatikai elemzés során szűrtük ki a mothur v1.35 (Schloss és mtsai, 2009) program segítségével. Az így nyert szekvenciasort SILVA Incremental Aligner (SINA) szoftver (Pruesse és mtsai, 2012) segítségével illesztettük, a taxonómiai azonosítás az ARB-SILVA SSU v123 referencia adatbázis (Quast és mtsai, 2013) használatával történt. A további vizsgálatokból az Archaea, kloroplasztisz, mitokondrium, eukarióta és ismeretlen eredetű szekvenciákat kizártuk. A szekvenciákat 95%-os bázissorrendbeli egyezés fölött rendeltük nemzetségekhez, míg 97%-os hasonlóság esetében operatív taxonómiai egységekhez (OTU) a faji szintű egyezésnek megfelelően (Tindall és mtsai, 2010). Az amplikon szekvenciák bioinformatikai elemzését Szabó Attila végezte.

A nyers szekvencia adatokat az NCBI Sequence Read Archive adatbázisban helyeztük el, melyek a PRJNA483930 BioProject azonosítón keresztül érhetők el.

5.7. Az adatok statisztikai elemzése

A diverzitás (Simpson, Shannon) és fajszámbecslő indexek (Sobs, Chao1, ACE) meghatározását a *mothur* v1.35 (Schloss és mtsai, 2009) programmal végeztük. Az északi és a déli rendszer barlangjaiból származó klontárak összehasonlítására „Two-way PERMANOVA” (kéttényezős többváltozós permutációs varianciaanalízis) tesztet (Bray-Curtis hasonlóság alapján, 9999 permutációval) végeztünk a *Past3* (PAleontological STatistics) programmal (Hammer és mtsai, 2001), hogy megállapítsuk a klontárak összetétele alapján léteznek-e szignifikáns különbségek ($p < 0,05$) a két rendszer, illetve a víz és biofilm minták baktériumközösségei között. A klónok mintánként eltérő száma miatt, a klónok relatív abundanciáját vettük alapul. Ugyanezt a kéttényezős varianciaanalízist végeztük el annak megállapítására, hogy az új generációs amplikonszekvenálással kapott bakteriális OTU-k összetételében van-e szignifikáns különbség az északi és déli rendszer, illetve a Molnár János-barlang, Diana-Hygieia- és Rudas-Török-forrásbarlangok között. A statisztikai összehasonlíthatóság miatt, az egyes minták szekvenciáit a legkisebb szekvenciaszámú minta alapján újramintavételeztük. Az újramintavételezés során minden mintából véletlenszerűen 1000-szer kiválasztottunk egy szekvenciahalmazt úgy, hogy minden mintánk a legkisebb szekvenciaszámú minta szekvenciaszámával legyen reprezentálva. A 2012-ben mért fizikai-kémiai változókbeli összetétel alapján főkomponens elemzést végeztünk a mintavételi helyek között. A minták közötti eltéréssel szignifikánsan ($p < 0,05$) korreláló változók meghatározásához a *vegan* programcsomag (Oksanen és mtsai, 2018) „*envfit*” funkcióját alkalmaztuk az *R* (*R* Core Team, 2018) programban. A bakteriális közösségek összetételbeli hasonlóságának meghatározására használt ordinációs elemzések (Főkomponens analízis, Nem Metrikus Többdimenziós Skálázás (NMDS)) szintén a *vegan* programcsomaggal készültek, az ábrázolásukhoz a *ggplot2* programcsomagot (Wickham, 2016) használtuk. A minták közti különbségekért felelős klónok és az új generációs szekvenálással kapott bakteriális OTU-k meghatározására *Simper*-tesztet végeztünk a *Past3* programmal (Hammer és mtsai, 2001).

6. Eredmények

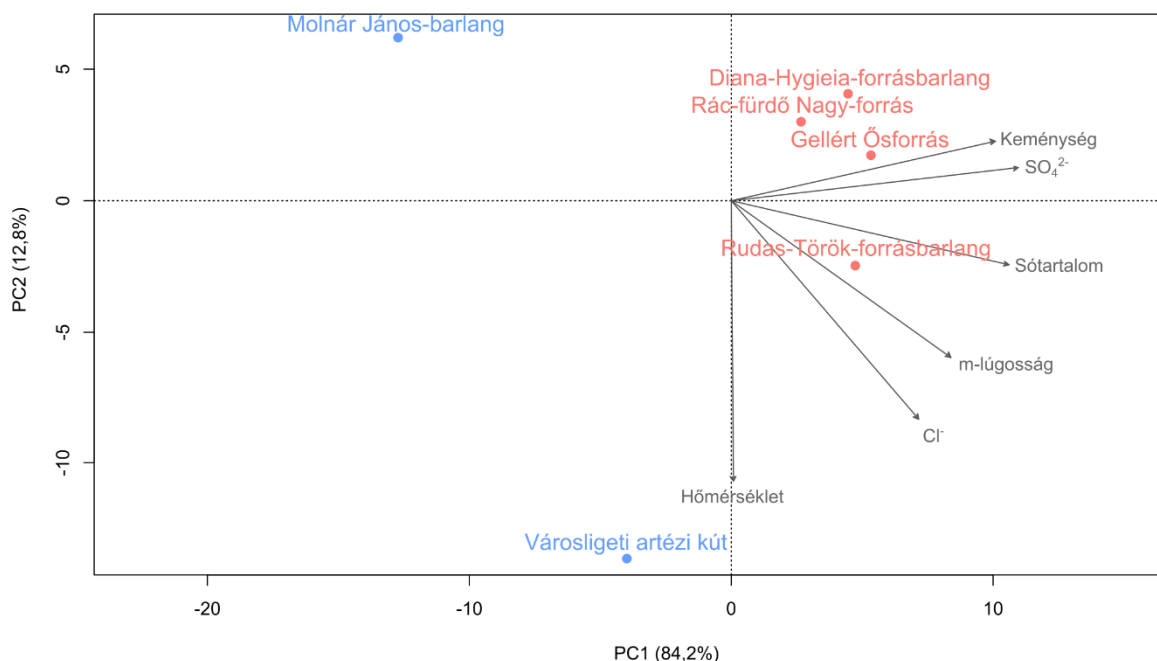
6.1. A BTK forrásvizeinek és a barlangi kőzetek felszínéhez kapcsolódó biofilmeknek a vizsgálata

A Budai Termálkarszt északi és déli rendszeréhez tartozó barlangok és forrásbarlangok prokarióta közösségszerkezetének, morfológiai tulajdonságainak, illetve a forrásvizek fizikai és kémiai paramétereinek megismerése céljából először 2012-ben végeztünk mikrobiológiai mintavételezést. Az északi rendszer esetében kettő mintavételi helyszínt, a Molnár János-barlangot és a Városligeti kútát, míg a déli rendszer esetében négy mintavételi helyszínt, a Gellért Ősforrást, a Diana-Hygieia- és a Rudas-Török-forrásbarlangot, valamint a Rác-fürdő Nagy-forrását jelöltük ki. A minták prokarióta közösségszerkezetének megismerésére először a molekuláris klónozás módszerét, míg a morfológiai tulajdonságok feltárására pásztázó elektronmikroszkópot alkalmaztuk.

6.1.1. A BTK forrásvizeinek fizikai és kémiai jellemzői

A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok 2012-ben mért fizikai és kémiai paramétereit a Függelék 1. táblázat tartalmazza. Az északi és déli rendszerhez tartozó források és forrásbarlangok vizére jellemző főbb fizikai és kémiai paraméterek változását főkomponens elemzésen alapuló biplot ábrán tüntettük fel (16. ábra). A két főkomponens a minták összvariáciájának mintegy 97%-át magyarázta. Az eredmények alapján megállapítható, hogy a déli rendszerhez tartozó Gellért Ősforrás, Rác-fürdő Nagy-forrás, Diana-Hygieia-forrás és Rudas-fürdő Török-forrás hasonlítottak egymáshoz a legjobban. Ezen forrásokat az északi rendszerhez képest nagy szulfát koncentráció ($354 \pm 15 \text{ mg l}^{-1}$), keménység ($32,6 \pm 1,6 \text{ nK}^\circ$), vezetőképesség ($1742 \pm 46 \text{ } \mu\text{S/cm}$), sótartalom ($1232 \pm 24 \text{ mg l}^{-1}$) és teljes szervesetlen szénmennyiség ($90 \pm 27 \text{ mg l}^{-1}$) értékek jellemezték.

Az északi rendszerhez tartozó Városligeti kút és a Molnár János-barlang fizikai-kémiai profilja jelentősen különbözött a déli rendszer forrásaitól. A Városligeti artézi kút vizének magas hőmérséklete ($73,7^\circ\text{C}$), míg a Molnár János-barlang vizének fizikai és kémiai paraméterei a mért sótartalomban, vezetőképességben, szulfát és kloridion koncentrációkban tértek el leginkább a többi forrás vizétől.



16. ábra. A BTK forrásainak és forrásbarlangjainak vizeire jellemző főbb fizikai és kémiai paramétereinek változását szemléltető főkomponens analízisen alapuló ábrája. A minták közötti eltéréssel szignifikánsan ($p < 0,05$) korreláló paramétereket az ábrán szürke nyilakkal jelöltük

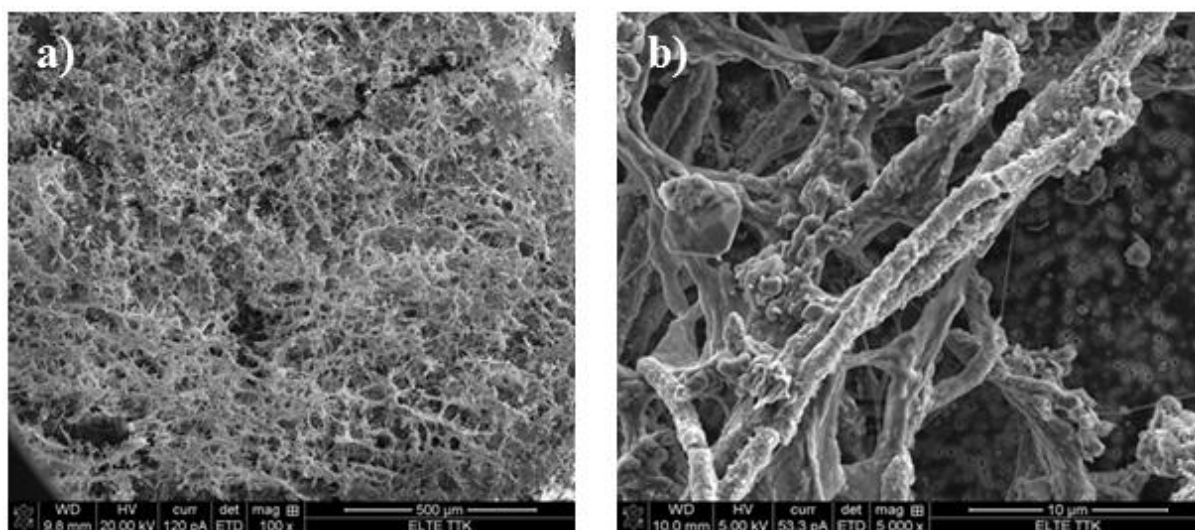
A BTK északi megcsapolódási rendszeréhez tartozó Molnár János-barlangot kitöltő vizek 2014-ben mért fizikai és kémiai paramétereit a Függelék 2. táblázat tartalmazza. A meleg vizet (MJW) magasabb keménység, vezetőképesség és kloridion koncentráció, a hideg vizet (MJC) magasabb pH és foszfát ion, míg a kevert vizet (MJM) magasabb ammónium, nitrit, nitrát és szulfát ion koncentrációk és lúgosság értékek jellemezték. Utóbbi két víztípusnál egyaránt magas zavarosság értékek voltak jellemzők.

A BTK déli megcsapolódási rendszeréhez tartozó Diana-Hygieia-forrásbarlangot kitöltő víz 2015-ben mért fizikai és kémiai paramétereit a Függelék 3. táblázat tartalmazza. A helyszíni mérések alapján a víz pH-ja 6,69, a hőmérséklete 31,6 °C, a vezetőképesség 1767 $\mu\text{S cm}^{-1}$ -nek adódott, melyek nagyon hasonlóak voltak a 2012-ben mért értékekhez. A forrásvízben kis összes szerves szénmennyiséget mutattunk ki ($<5 \text{ mg l}^{-1}$). Az anionok közül a klorid (156 mg l^{-1}) és a szulfát ionok (167 mg l^{-1}) mennyisége volt jelentős, akárcsak 2012-ben, ugyanakkor elmondható, hogy a szulfát ion koncentrációja 2012-ben több, mint a duplája volt a 2015-ben mért értéknek.

A BTK déli megcsapolódási rendszeréhez tartozó Rudas-Török-forrásbarlangot kitöltő víz 2014-ben mért fizikai és kémiai paramétereit a Függelék 4. táblázat tartalmazza. A helyszíni mérések alapján a víz pH-ja 6,65, a hőmérséklete 37,7 °C, a vezetőképesség 1508 $\mu\text{S cm}^{-1}$ -nek adódott, hasonlóan a 2012-ben mért adatokhoz. A forrásvízben szintén kis összes szerves szénmennyiséget mutattunk ki (3 mg l^{-1}). Az anionok közül ez esetben is, akárcsak a Diana-Hygieia-forrásbarlang esetében, a klorid (107 mg l^{-1}) és a szulfát ionok (171 mg l^{-1}) mennyisége volt jelentős. A szulfát ion koncentrációja 2012-ben szintén a duplája volt a 2014-ben mért értéknek.

6.1.2. A BTK-ból származó barlangi biofilm minták pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálati eredményei

A 2012 decemberi mintavételkor gyűjtött biofilm mintákról készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken jól látható, hogy a biofilmeket képező baktériumok nagyon változatos morfológiájúak (18-23. ábrák). A különböző vastagságú fonalas baktériumok mellett számos eltérő méretű, sejtsoportot képező pálca és kokkus alakú sejt látható. Az eltérő sejteket, sejtsoportokat szinte minden esetben nyálkás anyagba ágyazottan figyelhetjük meg. Ez a nyálka feltehetőleg az extracelluláris polimer mátrix (extracellular polymeric substances, EPS).

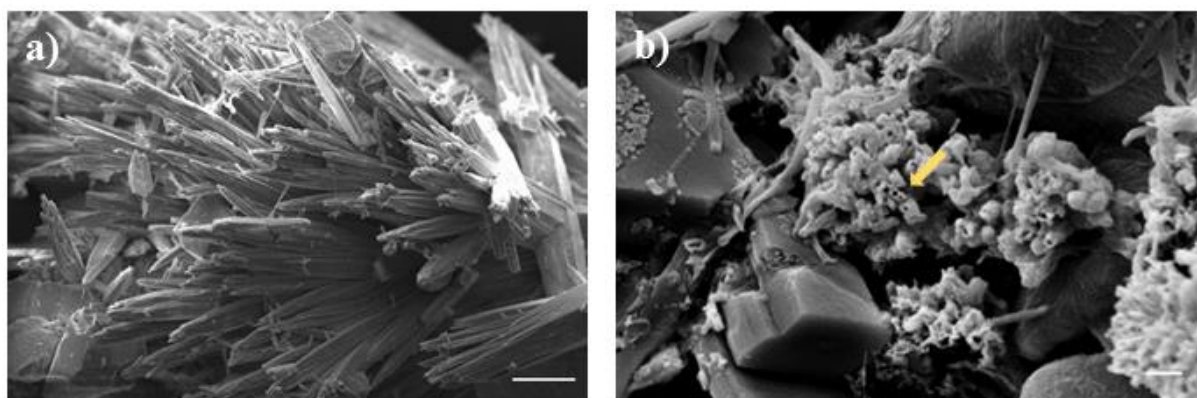


17. ábra. A Molnár János-barlangból származó 5%-os glutáraldehiddel fixált és liofilizálással szárított biofilm mintákról készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételek
a) A fonalas baktériumok alkotta hálózatos szerkezet b) Ásványi anyagokat a felszínükön felhalmozó fonalas morfológiájú sejtekről készült felvétel

A Molnár János-barlang barna biofilmjéről készült nagy felbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján (17. ábra) nagyon változatos morfológiát figyeltünk meg. A kisebb felbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételek (17. a ábra) alapján jól

látható a fonalas baktériumok alkotta hálózatos szerkezet. Az elektronmikroszkópos felvételeken jellegzetes *Leptothrix*-szerű fonalas baktériumokat láthatunk.

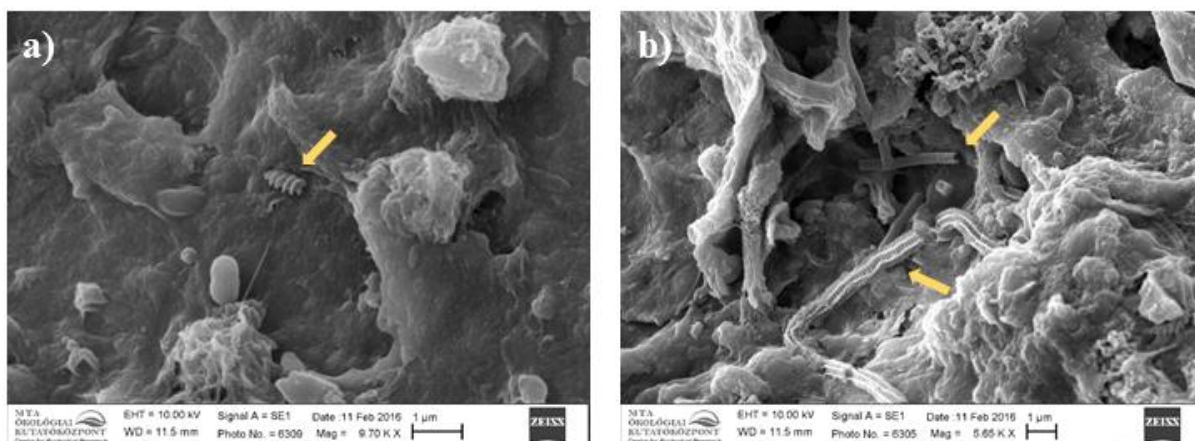
A Városligeti kút vízvezeték csövének falán megtelepedő biofilmről készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken (18. ábra) szintén jól látható, hogy a Molnár János-barlang barna biofilmjéhez hasonlóan változatos morfológiájú mikrobaközösség alkotja a biofilmet. A különböző kristályszerkezetű kalcium-karbonát ásványok jó kolonizációs felszínként szolgálhatnak a baktériumok számára. Az ásványok felszínén szerves anyagba ágyazottan 2-4 μm hosszúságú pálcika alakú sejtek, de különböző vastagságú fonalas, kokkus alakú, illetve csomókba rendeződött sejt aggregátumok is felfedezhetők. Nagyobb nagyításban apró üreges struktúrákat (18. b ábra) azonosítottunk, melyek vélhetőleg ásványi anyagokat felhalmozó sejtek maradványai lehetnek.



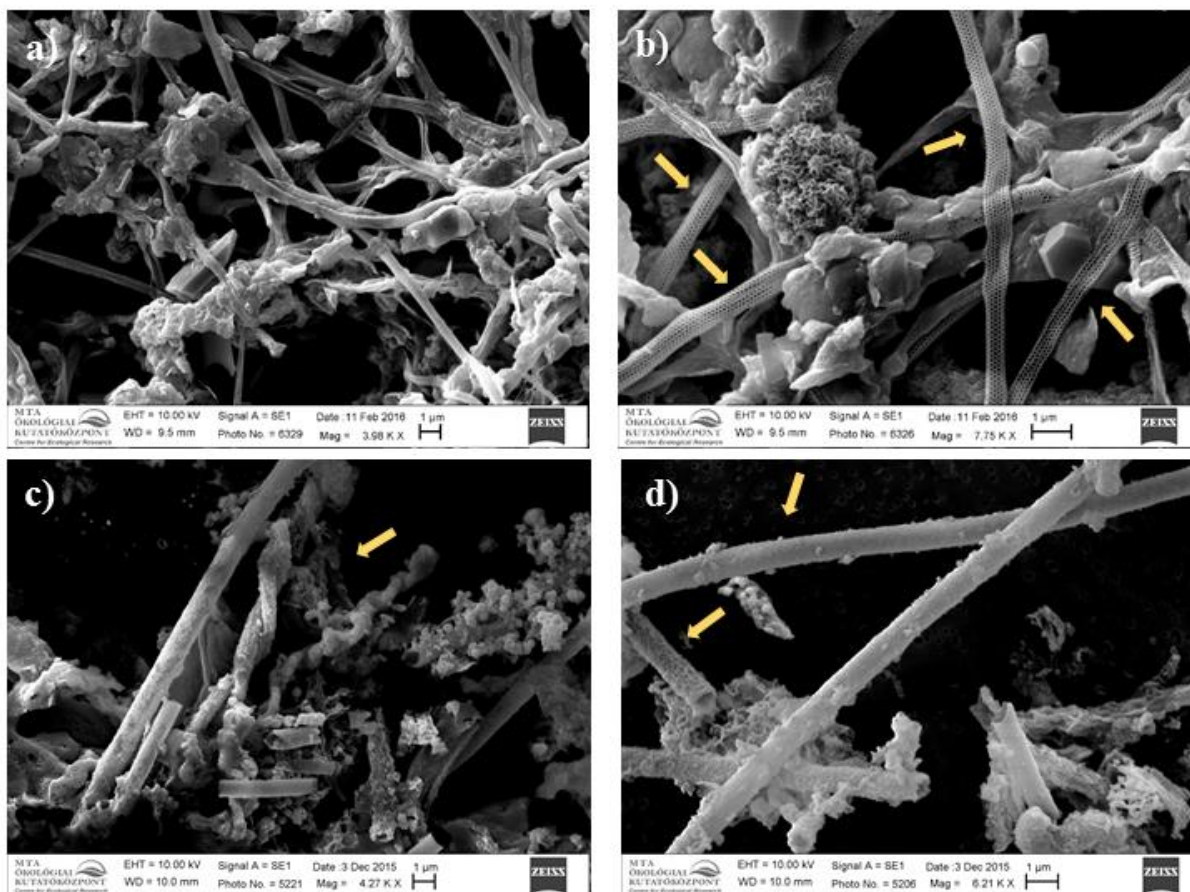
18. ábra. A Városligeti Széchenyi-fürdőt ellátó kút vízvezeték csövének falán megtelepedő biofilmről készült SEM felvételek

a) A különböző kristályszerkezetű kalcium-karbonát ásványok kolonizációs felszínként szolgálnak a baktériumok számára (mérték: 20 μm) b) Nagyobb nagyításban apró üreges struktúrák fedezhetők fel, melyek ásványi anyagokat felhalmozó sejtek maradványai lehetnek (sárga nyíl) (mérték: 1 μm)

A Gellért Ősforrásból származó biofilmről készült SEM felvételeken a *Nitrospira* nemzetségre jellemző spirális (19. a ábra), míg a Diana-Hygieia-forrásbarlang biofilmje esetében különleges retikulált sejtalakot (20. b ábra), *Gallionella* nemzetségre jellemző sejtmaradványokat (20. c.) és *Leptothrix*-szerű sejteket (20. c és d ábra) figyeltünk meg. A szokatlan hálószerű szálak struktúra ugyan a Gellért Ősforrás biofilmjéről készült felvételeken is megtalálható volt (19. b ábra), de a Diana-Hygieia-forrásbarlang biofilmjének felvételein rendkívül abundánsnak is bizonyult.



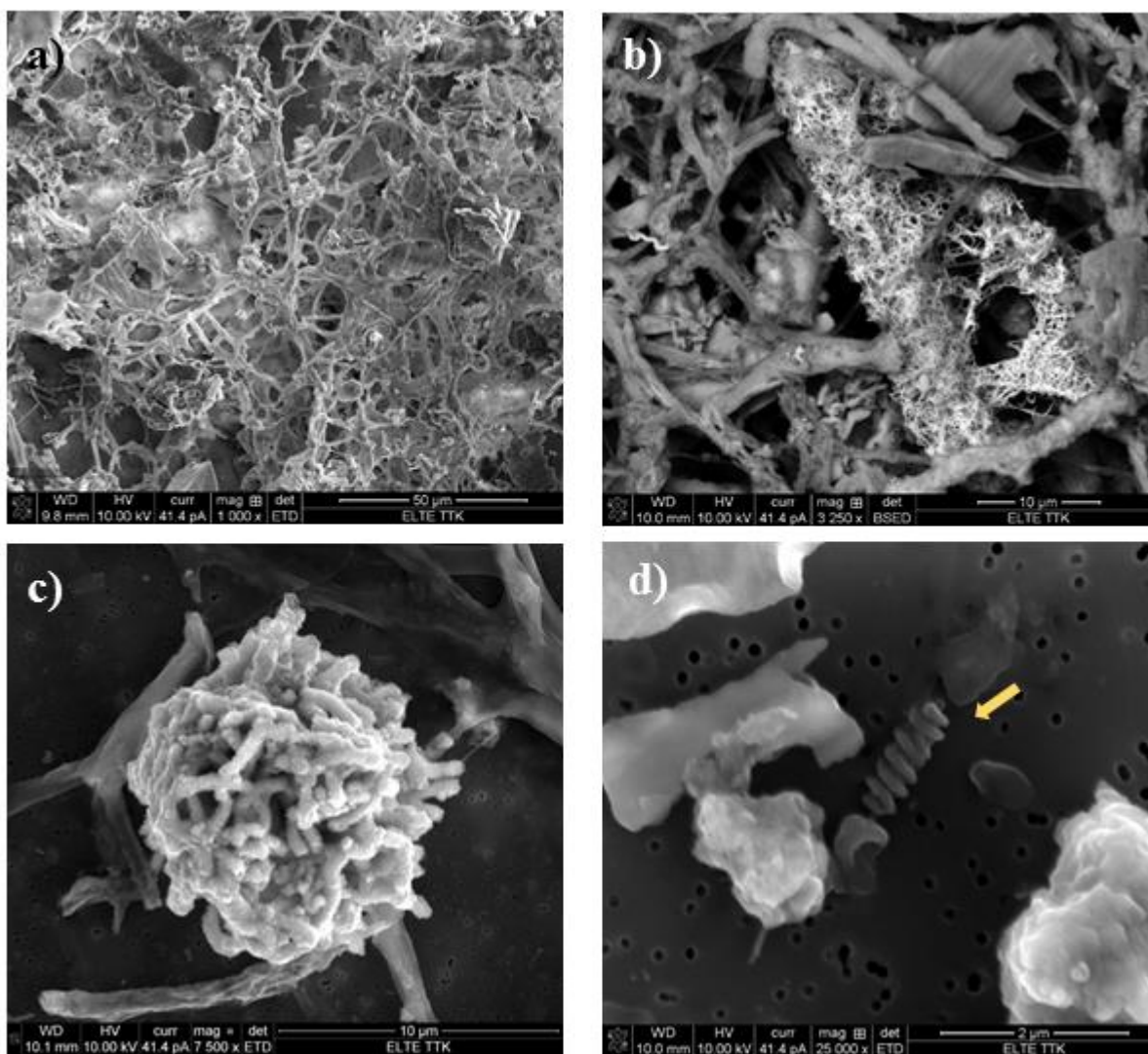
19. ábra. A Gellért Ősforrásból származó biofilmről készült SEM felvételek
a) Jellegzetes alakú *Nitrospira*-szerű sejt középen (nyíl) b) Különböző morfológiájú, főként fonalas alakú mikrobák (felső nyíl: csószerű képletet képző *Leptothrix*-szerű képződmény maradványok; alsó nyíl: különleges retikulált sejtalkak)



20. ábra. A Rudas-fürdő Diana-Hygieia-forrásbarlangjának barnás-vörös biofilmjéről készült SEM felvételek
a) A fonalas baktériumok által kialakított hálózatos struktúra b) Különleges, retikulált filamentumok és ásványok a biofilmben ágyazódva (sárga nyilak) c) Jellegzetes szalag alakú vastartalmú függelékkel rendelkező *Gallionella* nemzetségre jellemző maradványok (sárga nyíl) d) fonalas *Leptothrix*-szerű baktériumok (sárga nyilak) az általuk felhalmozott ásványi képződményekkel

A Rudas-fürdő Török-forrásából származó biofilmről készült nagy felbontású felvételen (21. a ábra) fonalas baktériumokból álló szövedék látható. A visszaszórt elektronos

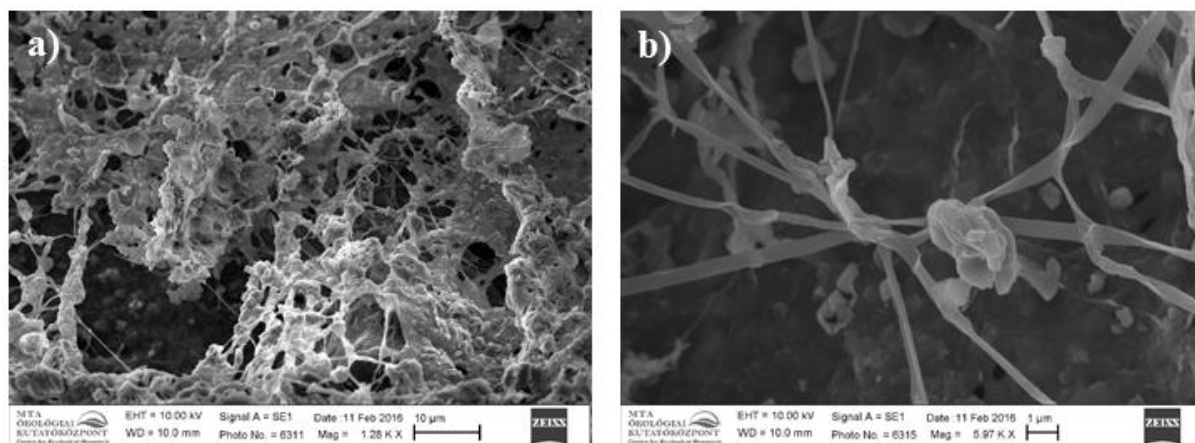
(Backscattered Secondary Electron Detector, BSED) üzemmódban készült felvételen (21. b ábra) jól látható, hogy egyes sejtek a környezetükhöz képest jobban, fehérebben világítanak, ami azt jelzi, hogy magasabb atomszámú elemeket tartalmazó részeket, vasvegyületeket, nehézfémeket hordozhatnak. A 20. b ábrán látható csőszerű képződmény ásványokat felhalmozó fonalas baktériumok sokaságából épül fel. A Rudas-fürdő Török forrásának biofilmjét képző baktériumokra szintén nagyon változatos morfológia volt jellemző, pálcika alakú sejtekből álló sejtaggregátumot *Leptothrix*-szerű mikrobákkal (21. c ábra), illetve jellegzetes *Nitrospira*-szerű sejtet is megfigyeltünk (21. d ábra).



21. ábra. A Rudas-fürdő Török-forrásából származó barnás-vöröses biofilmről készült SEM felvételek

a) Hálózatos szerkezetű, különböző morfológiájú mikrobák alkotta biofilm **b)** Viasszaszórt elektronos üzemmódban készült kép vasvegyületeket felhalmozó fonalas baktériumról **c)** Pálcika alakú sejtekből álló sejtaggregátum közepén és körülöttük fonalas, *Leptothrix*-szerű mikrobák **d)** Jellegzetes alakú *Nitrospira*-szerű sejt (sárga nyíl)

A Rác-fürdő Nagy-forrásának biofilmjéről készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken különböző morfológiájú mikrobák alkotta hálózatos szerkezetet (22. a ábra) figyelhetünk meg, akárcsak a Molnár János-barlang, Rudas-fürdő Diana-Hygieia, illetve Török-források esetében is, nyálkás anyagba ágyazottan. A nagyobb nagyítású felvételen (22. b ábra) hosszú, vékony fonalas baktériumokból álló szövedék látható.



22. ábra. Rác-fürdő Nagy-forrásának biofilmjéről készült SEM felvételek

a) Különböző morfológiájú mikrobák alkotta hálózatos szerkezetű nyálkás biofilm b) Hosszú, fonalas baktériumokból álló szövedék

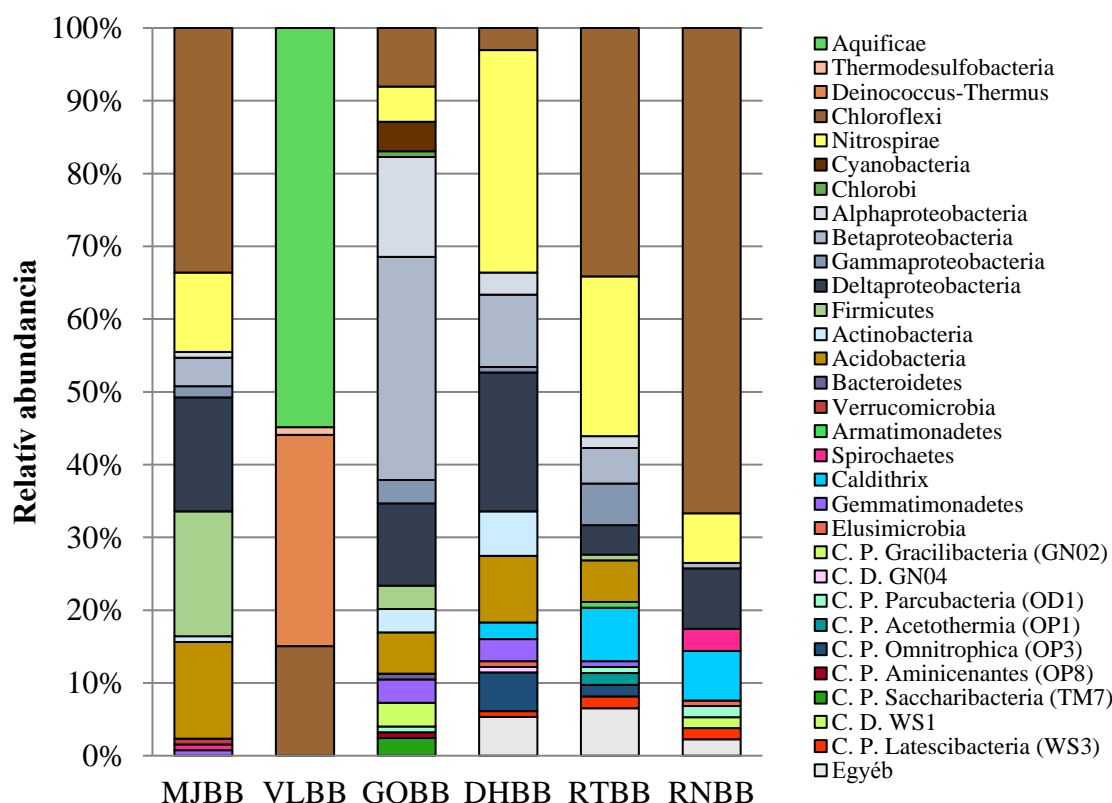
6.1.3. A BTK forrásvizeinek és a barlangi biofilmeknek molekuláris klónozáson alapuló közösségszerkezeti vizsgálati eredményei

A 2012 decemberében a BTK hat mintavételi helyszínén gyűjtött minták mikrobiológiai vizsgálata során összesen 16 (10 Bacteria és 6 Archaea) molekuláris klontárat hoztunk létre. A biofilm mintákból minden esetben Bacteria és Archaea alapú klontárat is létrehoztunk. A vízminták esetén az északi rendszer mindkét pontjáról, így a Molnár János-barlang és a Városligeti kút vizéből is, míg a déli rendszerből két pontról, a Diana-Hygieia- és a Rudas-Török-forrásbarlangok vizeiből hoztunk létre Bacteria alapú molekuláris klontárakat. A 2012. decemberi minták molekuláris klontárainak feldolgozásakor összesen 1777 molekuláris klón (víz Bacteria klónok: 484, biofilm Archaea klónok: 562, biofilm Bacteria klónok: 731) taxonómiai besorolását végeztük el.

A 2012-ben gyűjtött biofilm minták baktériumközösségeiben a Chloroflexi, a Nitrospirae, a Proteobacteria, a Firmicutes és az Aquificae törzsek képviselői voltak dominánsak (23. ábra). A molekuláris klónok nagy része a legnagyobb szekvenciaegyezést hasonló élőhelyek (barlangi mikrobiális biofilm, karsztvíz, hőforrás) környezeti klónjaival mutatta. Jóllehet a molekuláris klónok nagy részét fajok, illetve nemzetségek szintjén is alig

lehetett azonosítani, hiszen a 16S rRNS gén szekvenciaegyezések messze az elfogadott határértékek alatt voltak (Stackebrandt és Goebel, 1994).

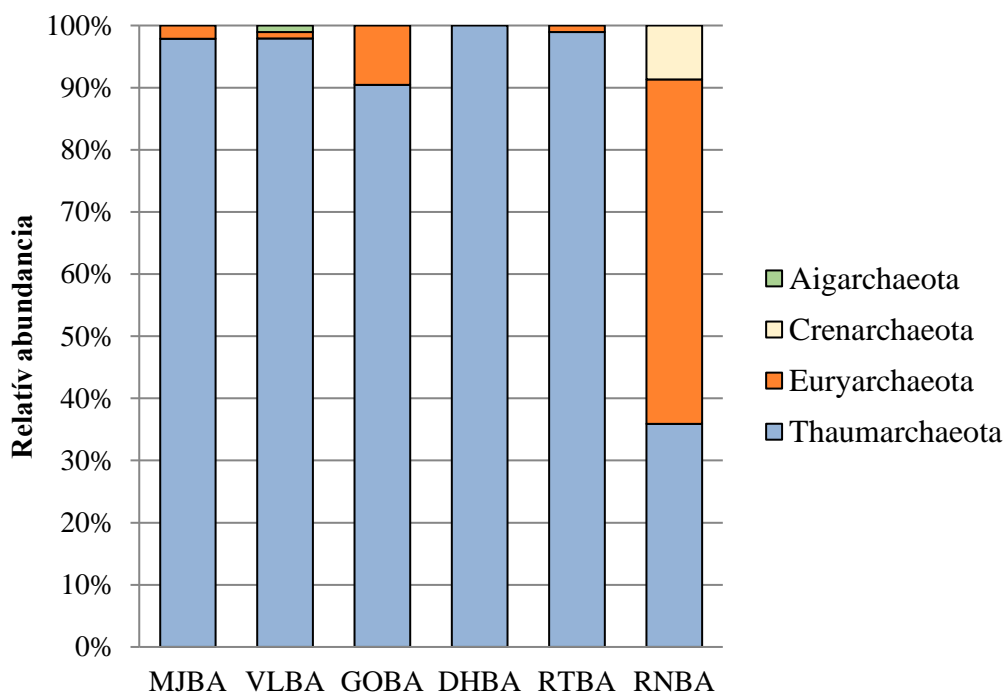
Az északi rendszerhez tartozó Városligetikut esetében mutattuk ki a legalacsonyabb (törzs szintű) taxonómiai diverzitást. A molekuláris klónok közül egyedül a Chloroflexi törzs képviselői voltak jelen mindegyik mintában, bár eloszlásuk mintánként nagyon különbözött (23. ábra). Képviselőik az MJBB (34%), az RTBB (34%) és az RNBB (67%) mintákban fordultak elő a legnagyobb arányban. Mindegyik biofilm minta esetében a molekuláris klónok a Chloroflexi törzsen belül a legnagyobb szekvenciaegyezést (82-91%-os hasonlósággal) az Anaerolineales, illetve a Caldilineales rend képviselőivel mutatták. A Nitrospirae törzs, továbbá a Betaproteobacteria és a Deltaproteobacteria osztályok tagjait a VLBB minta kivételével mindegyik biofilm mintából azonosítottuk, bár mintánként ez esetben is jelentős aránybeli különbségek voltak felfedezhetők. A Deltaproteobacteria osztályhoz tartozó, a kén, a szulfát, a nitrát, és a ferri(III)-ionok redukciójában fontos szerepet betöltő *Deferribacter*, *Deferrisoma* és *Desulfuromonas* nemzetségek képviselőit, a VLBB minta kivételével, szinte minden biofilm minta esetében kimutattuk.



23. ábra. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok biofilmjeinek molekuláris klónozással feltárt baktériumközösségeinek megoszlása törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetében osztályok szintjén
(rövidítések: C. P., Candidate Phylum; C. D. Candidate Division)

A Nitrospirae törzs képviselőinek domináns előfordulása a DHBB mintára (31%) volt jellemző, míg az RTBB minta esetében ez a törzs volt a második domináns közösségalkotó (22%) taxonómiai csoport (23. ábra). Ez utóbbi két minta esetében az autotróf nitrit-oxidáló Nitrospirales rend, az anaerob metán-oxidáló *Methylothermobacter* és az anaerob, termofil szulfát-redukáló *Thermodesulfobacter* nemzetségek képviselői voltak gyakoriak.

A GOBB minta esetében a Betaproteobacteria osztály dominanciáját (31%) mutattuk ki (23. ábra), míg a VLBB mintában az Aquificae törzs képviselői fordultak elő legnagyobb arányban (55%). A VLBB klónkönyvtárban leggyakoribb Aquificae törzsbe tartozó klónok a legnagyobb szekvenciaegyezést (91.4-99.9%-os hasonlósággal) a termofil hidrogén-oxidáló *Sulfurihydrogenibium azorense* baktériumfajjal (Aquificales rend) mutatták. A VLBB biofilm klónok között nagy arányban fordultak elő a Deinococcus-Thermus törzs (30%) képviselői is (23. ábra). A törzs tagjai között kizárólag a *Thermus* nemzetség képviselői voltak jelen. Az Alphaproteobacteria és Gammaproteobacteria osztályok képviselői az RNBB és VLBB minták kivételével minden mintában megtalálhatóak voltak. A Bacteroidetes, Verrucomicrobia, Armatimonadetes, Spirochaetes, Caldithrix, Elusimicrobia, valamint a candidatus törzsek képviselői általában egy-két mintában jelentek csak meg szórványos előfordulással (23. ábra). A biofilm mintákban nagy arányban detektáltunk tenyésztésbe nem vont klónszekvenciákat.

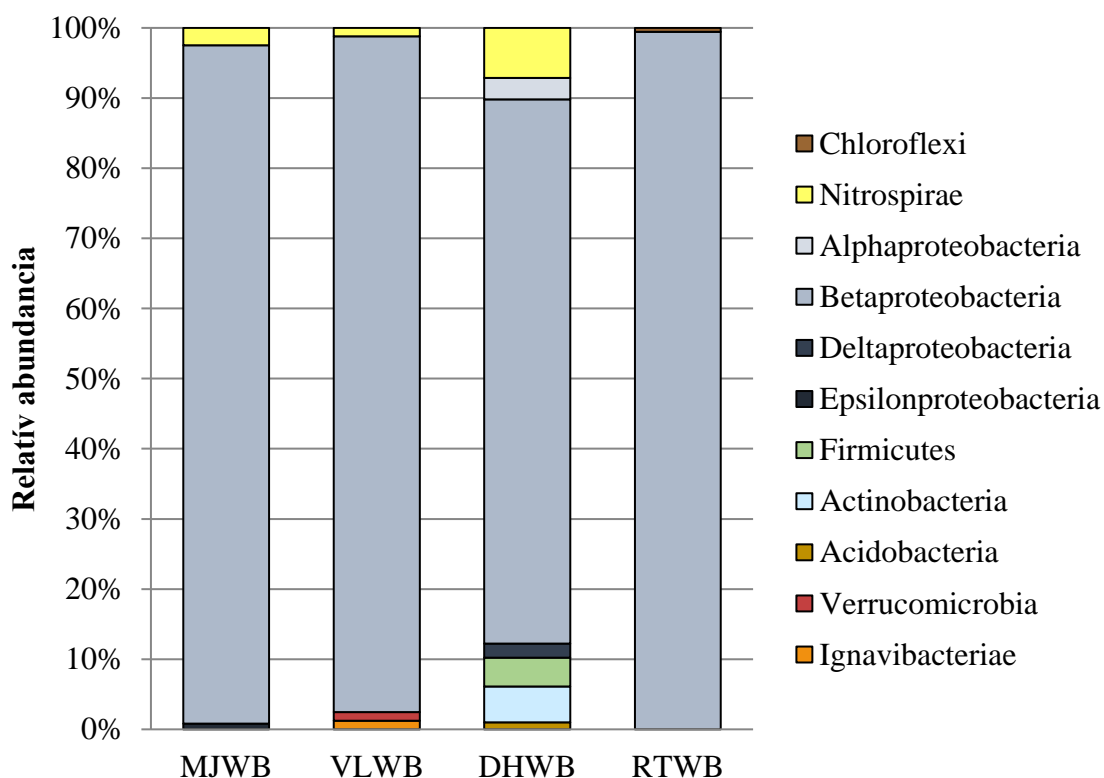


24. ábra. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok biofilmjeinek molekuláris klónozással feltárt ősbaktériumainak megoszlása törzsek szintjén

A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok biofilmjeiből létrehozott Archaea alapú klóntárak esetében mind a Thaumarchaeota, Euryarchaeota, Crenarchaeota, illetve Aigarchaeota törzsek képviselőit azonosítottuk (24. ábra).

Az RNBA minta kivételével a mintákban a legnagyobb arányban (90-100%) a Thaumarchaeota törzs képviselői fordultak elő. Mindegyik biofilm mintában a törzshöz tartozó ammónia-oxidáló Archaea (AOA) szervezetek (pl. „*Candidatus Nitrososphaera gargensis*”, *Nitrososphaera viennensis*, „*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*) nagy arányban voltak azonosíthatóak.

Az RNBA minta esetében az Euryarchaeota törzs dominanciáját (55%) mutattuk ki zömmel tenyésztésbe nem vont alacsony szekvenciaegyeztetésű klónokkal. Az Aigarchaeota törzs egyetlen tagját egyedül a Városligeti kút biofilmjéből létrehozott klóntár esetében azonosítottuk, mely klón a „*Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*” baktériumfajjal mutatta a legnagyobb szekvenciaegyeztést.

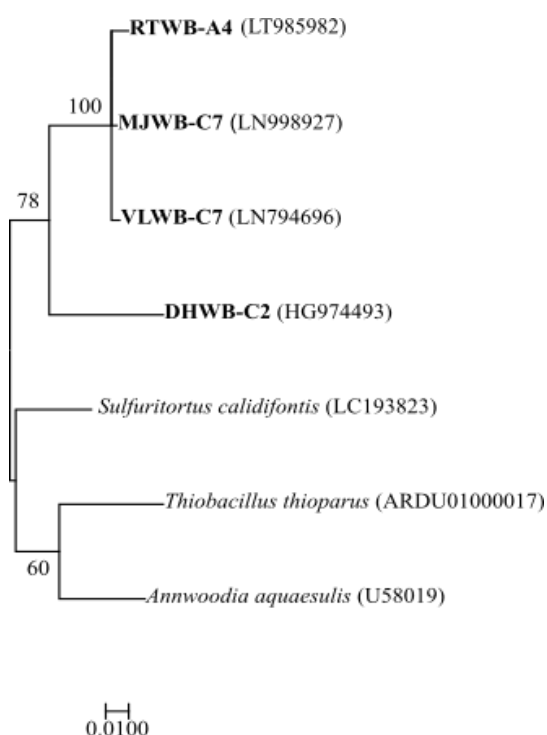


25. ábra. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz mintáinak molekuláris klónozással feltárt baktériumközösségeinek megoszlása törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetében osztályok szintjén

A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok közül a Molnár János-barlang, a Városligeti kút, a Diana-Hygieia- és Rudas-Török-forrásbarlangok vizeiből

hoztunk létre Bacteria alapú klontárakat. A vizsgált klontárakban kivétel nélkül a Betaproteobacteria osztály dominanciáját (78-99%) mutattuk ki (25. ábra). A Nitrospira törzs képviselői az RTWB minta kivételével szintén mindegyik klontárban megtalálhatók voltak.

A vízmintákból létrehozott klontárakat minden esetben szinte kizárólag egy, a Betaproteobacteria osztályba sorolható filotípus előfordulása jellemezte (25. ábra). A vízminták legabundánsabb klónjainak és a velük legközelebbi filogenetikai rokonságban lévő baktériumfajok törzsfáját az 26. ábra szemlélteti.



26. ábra. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó vízminták legabundánsabb klónjainak és a velük legközelebbi rokonságban lévő baktériumfajok neighbour-joining módszerrel készült filogenetikai törzsfája

A Rudas-Török-forrásbarlang és a Városligeti Széchenyi-fürdő termálforrásának vízmintáiban előforduló klónok döntő többsége a fakultatív kemolitoautotróf kén-oxidáló anyagcserével jellemezhető *Annwoodia aquaesulis* baktériumfajjal mutatták a legnagyobb (93 illetve 94%-os hasonlóság) szekvenciaegyeztést. A Diana-Hygieia-forrásbarlang DHWB-C2 jelzésű klónja a *Thiobacillus thioparus* (91%-os hasonlóság), míg a Molnár János-barlang MJWB-C7 jelzésű klónja az autotróf kén-oxidáló *Sulfuritortus calidifontis* fajjal mutatta a legnagyobb (94%-os hasonlóság) szekvenciaegyeztést.

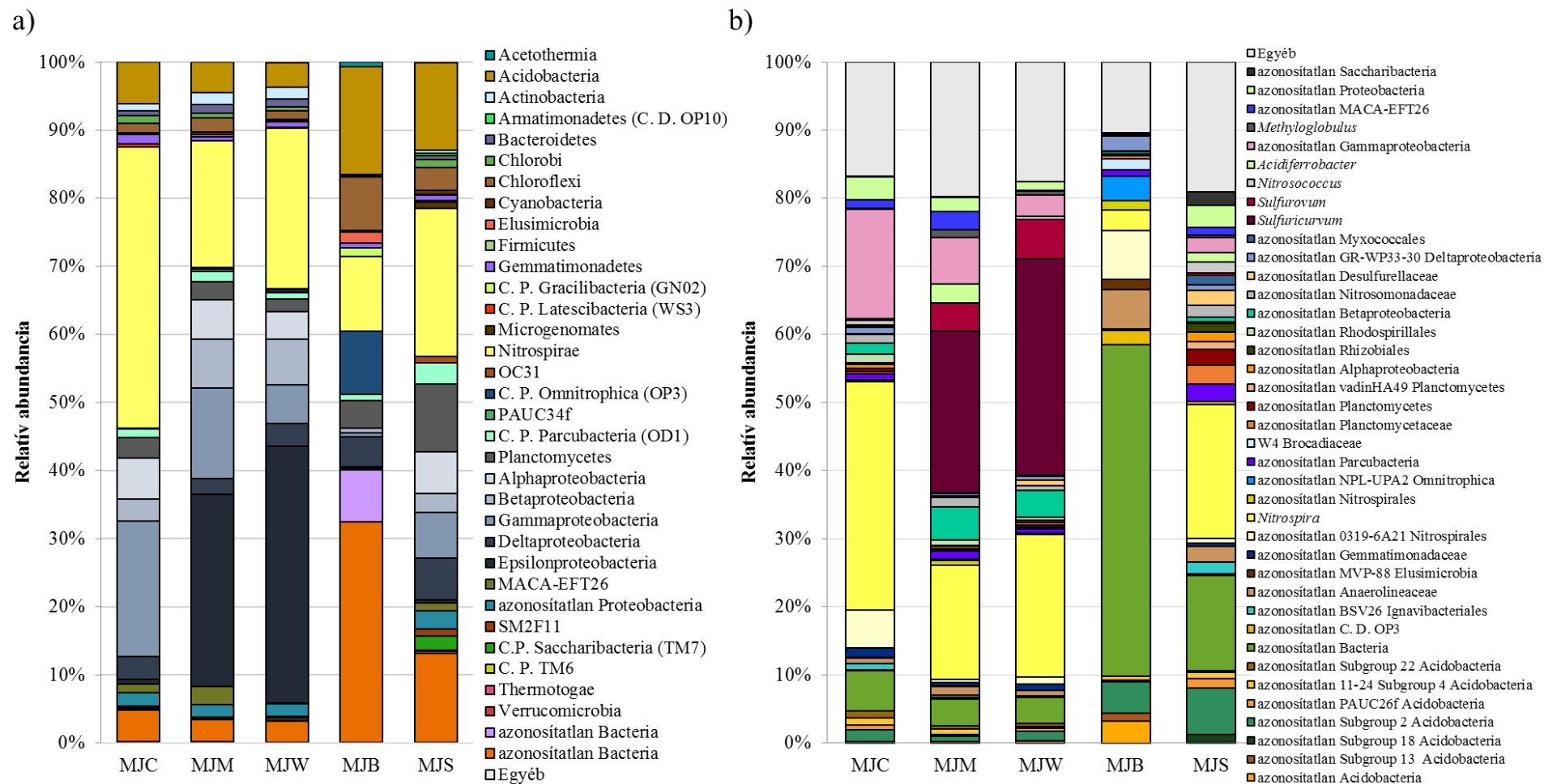
6.2. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó forrásbarlangok 2014. és 2015. évi mintavételeket követő vizsgálata

6.2.1. A Rózsadombhoz tartozó Molnár János-barlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással

A Molnár János-barlangból gyűjtött biofilm, üledék és vízminták szekvenálása során összesen 17312 baktériumszekvencia azonosítását végeztük el. A mintákban a Proteobacteria, az Acidobacteria, a Chlorobi, a Chloroflexi, a Nitrospirae, a Planctomycetes és nem azonosítható Bacteria törzsek domináltak (27. a ábra). A biofilm mintában a domináns taxon egy azonosítatlan Bacteria törzs (49%), az üledék mintában a Proteobacteria törzs (26%), a hideg vízmintában a Nitrospirae törzs (41%), a kevert vízmintában a Proteobacteria törzs (61%), míg a meleg vízmintában szintén a Proteobacteria törzs (59%) volt.

A biofilm mintában az azonosítatlan Bacteria törzs mellett a Nitrospirae, az Acidobacteria és a Chloroflexi törzsek képviselőinek nagy arányát detektáltuk. A mintában az azonosítatlan Anaerolineaceae (6%), illetve az azonosítatlan Bacteria (49%), azonosítatlan Acidobacteria 2-es alcsoportját (5%), azonosítatlan Nitrospirales (7%) és a *Nitrospira* (3%) nemzetségeket mutattuk ki. Az üledékmintában a biofilm mintához hasonlóan, szintén nagy arányban tűntek fel a *Nitrospira* nemzetséghez (20%), az azonosítatlan Bacteria (14%), illetve az azonosítatlan Acidobacteria nemzetséghez (7%) köthető szekvenciák.

A barlangot kitöltő hideg, meleg és kevert vizek esetében a Nitrospirae (18-41%) és Proteobacteria (36-61%) törzsek dominanciáját mutattuk ki. A Nitrospirae törzshöz tartozó *Nitrospira* nemzetség tagjai nagy arányban (17-34%) kerültek elő mindhárom típusú vízből. Az Epsilonproteobacteria osztály képviselői kizárólag a meleg és a kevert vizekből kerültek elő és dominánsnak is bizonyultak, míg az osztály képviselői a biofilm és üledék mintákból is teljesen hiányoztak. A meleg és kevert vizekben a kemolitoautotróf kén-oxidáló *Sulfuricurvum* és *Sulfurovum* nemzetségek (Epsilonproteobacteria) voltak a leggyakoribbak (27. b ábra).



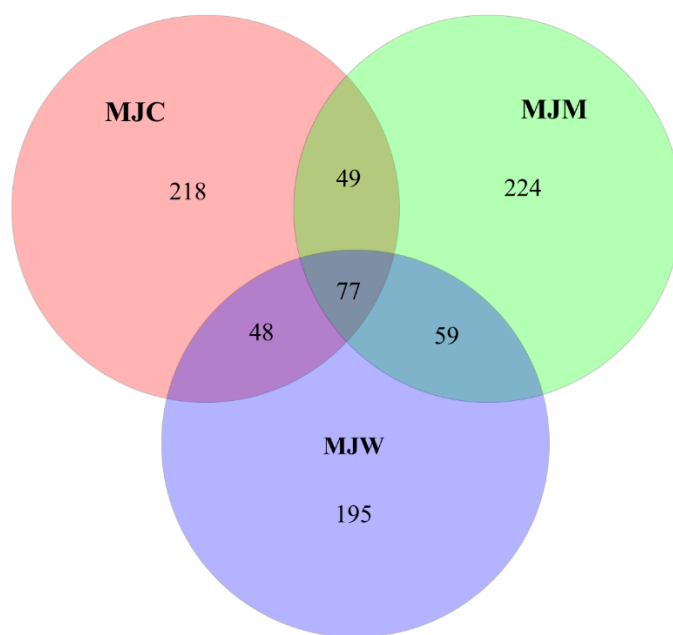
27. ábra. A Molnár-János barlangból gyűjtött biofilm, víz és üledék minták piroszekvenálással meghatározott baktériumközösségei
a) törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetében osztályok, illetve b) nemzetség szinten

Az Egyéb kategóriába a kevesebb, mint 1% relatív abundanciával rendelkező taxonokat soroltam a törzsek és nemzetségek esetében

A fajszámbecslő indexek alapján (Sobs, Chao1, ACE) elmondható, hogy a baktériumok OTU száma a biofilm mintában 166 volt, míg a többi minta esetében 281-310 OTU-t mutattunk ki. A diverzitás indexek (Shannon és inverz Simpson) az MJW mintában voltak a legkisebbek, míg az MJS mintában a legnagyobbak (2. táblázat).

2. táblázat. Az amplikonszekvenálás során kapott bakteriális OTU-k száma, valamint a fajszámbecslő és diverzitás indexek a Molnár János-barlangban
A feltüntetett értékek az adathalmaz újramintavételezésének átlagértékeit jelölik (zárójelben az adott könyvtárból származó összes szekvencia száma látható)

Minta nevek	Szekvenciaszám	Sobs	Chao1	ACE	Shannon	inverz Simpson
MJB	1603 (1603)	166	166	167	4,4	49,3
MJC	1603 (3545)	310	425	486	4,3	21,0
MJM	1603 (4430)	304	456	552	4,2	15,0
MJW	1603 (4301)	281	430	559	3,7	8,8
MJS	1603 (3433)	305	380	399	4,9	51,4



28. ábra. A Molnár János-barlangot kitöltő hideg (MJC), meleg (MJW) és kevert vízmintákat (MJM) alkotó OTU-k megoszlása Venn-diagramon

A Molnár János-barlangot kitöltő hideg, meleg és kevert vízmintákat alkotó OTU-k Venn-diagramon való ábrázolása alapján jól látható, hogy a hideg vízmintában 218, a kevert vízmintában 224, míg a meleg vízmintában 195 OTU volt megtalálható az újramintavételezett adatok között (28. ábra). A három vízmintában összesen 77 közös OTU-t találtunk.

6.2.2. A Gellért-hegyhez tartozó Diana-Hygieia-forrásbarlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással

A BTK Diana-Hygieia-forrásbarlang járatainak oldaláról gyűjtött biofilm, kalcit és üledék minták szekvenálása során összesen 5559 bakteriális szekvencia azonosítását végeztük el. A mintákban a legjelentősebb taxonok az alábbiak voltak: azonosítatlan Bacteria, Nitrospirae, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Chloroflexi és a Planctomycetes.

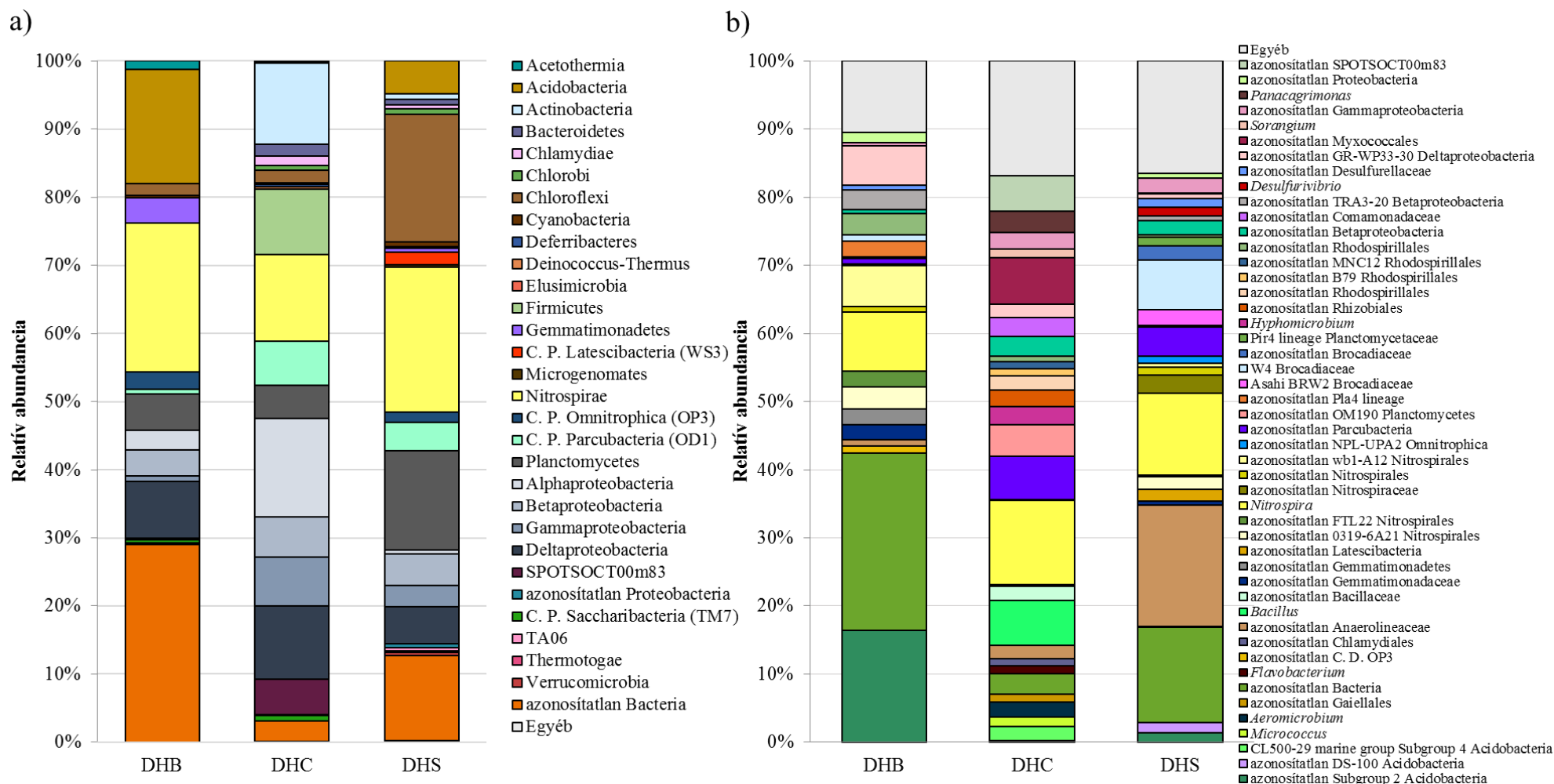
A biofilm minta esetében a legmeghatározóbb törzsek az azonosítatlan Bacteria (26%), a Nitrospirae (22%), illetve a Proteobacteria (17%) voltak (29. a ábra). A mintában legnagyobb arányban az azonosítatlan Bacteria (26%), azonosítatlan Acidobacteria 2-es alcsoportja (16%), *Nitrospira* (9%), azonosítatlan wb1-A12 Nitrospirales (6%) és azonosítatlan GR-WP33-30 Deltaproteobacteria (6%) nemzetségeket detektáltunk.

A kalcit mintában szintén nagy arányban (12%) fordultak elő a *Nitrospira* nemzetség képviselői a biofilm mintával megegyezően. A kalcit mintában a *Nitrospira* nemzetségen kívül még a *Bacillus* (7%), azonosítatlan Parcubacteria (7%) és azonosítatlan *Myxococcales* (7%) nemzetségek voltak dominánsak (29. b ábra).

A Diana-Hygieia-forrásbarlangban a legkisebb OTU szám (109) a biofilm mintában, míg a legnagyobb (163) az üledék mintában volt tapasztalható. A Shannon diverzitás index a DHB mintában volt a legkisebb, míg a DHS mintában a legnagyobb, viszont az inverz Simpson index a DHC mintában volt a legnagyobb (3. táblázat).

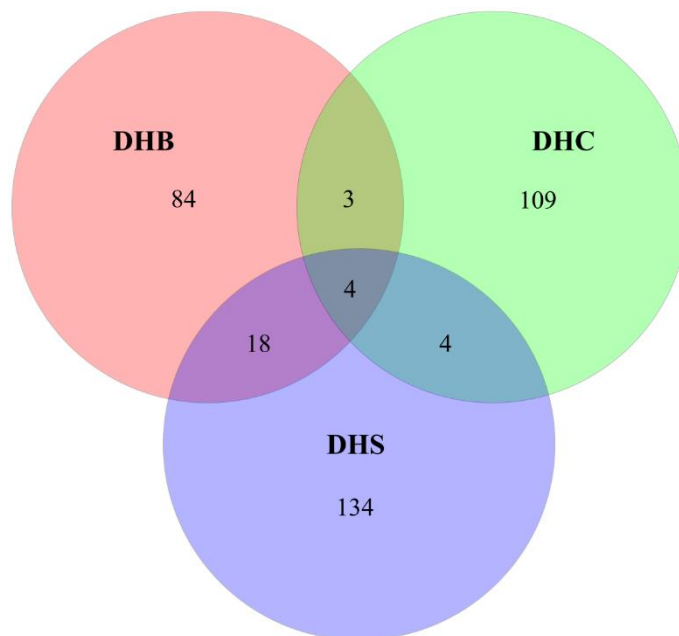
3. táblázat. Az amplikonszekvenálás során kapott bakteriális OTU-k száma, valamint a fajszámbecslő és diverzitás indexek a Diana-Hygieia- forrásbarlangban
A feltüntetett értékek az adathalmaz újramintavételezésének átlagértékeit jelölik (zárójelben az adott könyvtárból származó összes szekvencia száma látható)

Minta nevek	Szekvenciaszám	Sobs	Chao1	ACE	Shannon	inverz Simpson
DHB	906 (906)	109	111	114	3,9	29,5
DHS	906 (1816)	163	195	202	4,2	28,5
DHC	906 (2837)	124	155	164	4,1	35,5



29. ábra. A Diana-Hygieia-forrásbarlangból gyűjtött biofilm, kalcit és üledék minták piroszekvenálással meghatározott baktériumközösségei
a) törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetében osztályok illetve b) nemzetség szinten
Az Egyéb kategóriába a kevesebb, mint 1% relatív abundanciával rendelkező taxonokat soroltam a törzsek és a nemzetségek esetében

Az üledék mintában akárcsak a biofilmben az azonosíthatatlan Bacteria (14%), illetve az azonosíthatatlan Anaerolineaceae (17%) taxonok voltak meghatározóak. Utóbbi csoport a biofilm és kalcit mintában is megtalálható volt, bár nem volt meghatározó. A Diana-Hygieia-forrásbarlang üledék mintájában nagy arányban fordultak elő a kalcit és biofilm mintával megegyezően a *Nitrospira* nemzetség (12%) tagjai is. A felsorolt taxonokon kívül a mintában még az azonosíthatatlan W4 Brocadiaceae csoport (7%) volt jelentős.



30. ábra. A Diana-Hygieia-forrásbarlangból gyűjtött biofilm (DHB), kalcit (DHC) és üledék (DHS) mintákat alkotó OTU-k megoszlása Venn-diagramon

A Diana-Hygieia-forrásbarlang biofilm, kalcit és üledék mintákban található OTU-k megoszlását reprezentáló Venn-diagram alapján elmondható, hogy a DHB mintát 84, a DHC mintát 109, míg a DHS mintát 134 OTU alkotta (30. ábra). A három típusú mintában 4 OTU volt közös. Számos OTU csak egy-egy adott mintára jellemző.

6.2.3. A Gellért-hegyhez tartozó Rudas-Török-forrásbarlang baktériumközösségeinek vizsgálata amplikon szekvenálással

A Rudas-Török-forrásbarlangból 2014 novemberében vettünk ismételt biofilm és kalcit mintákat, hogy a 16S rRNS gén variábilis V3-V4 régióját nagy áteresztőképességű piroszekvenálás módszerével is megvizsgáljuk.

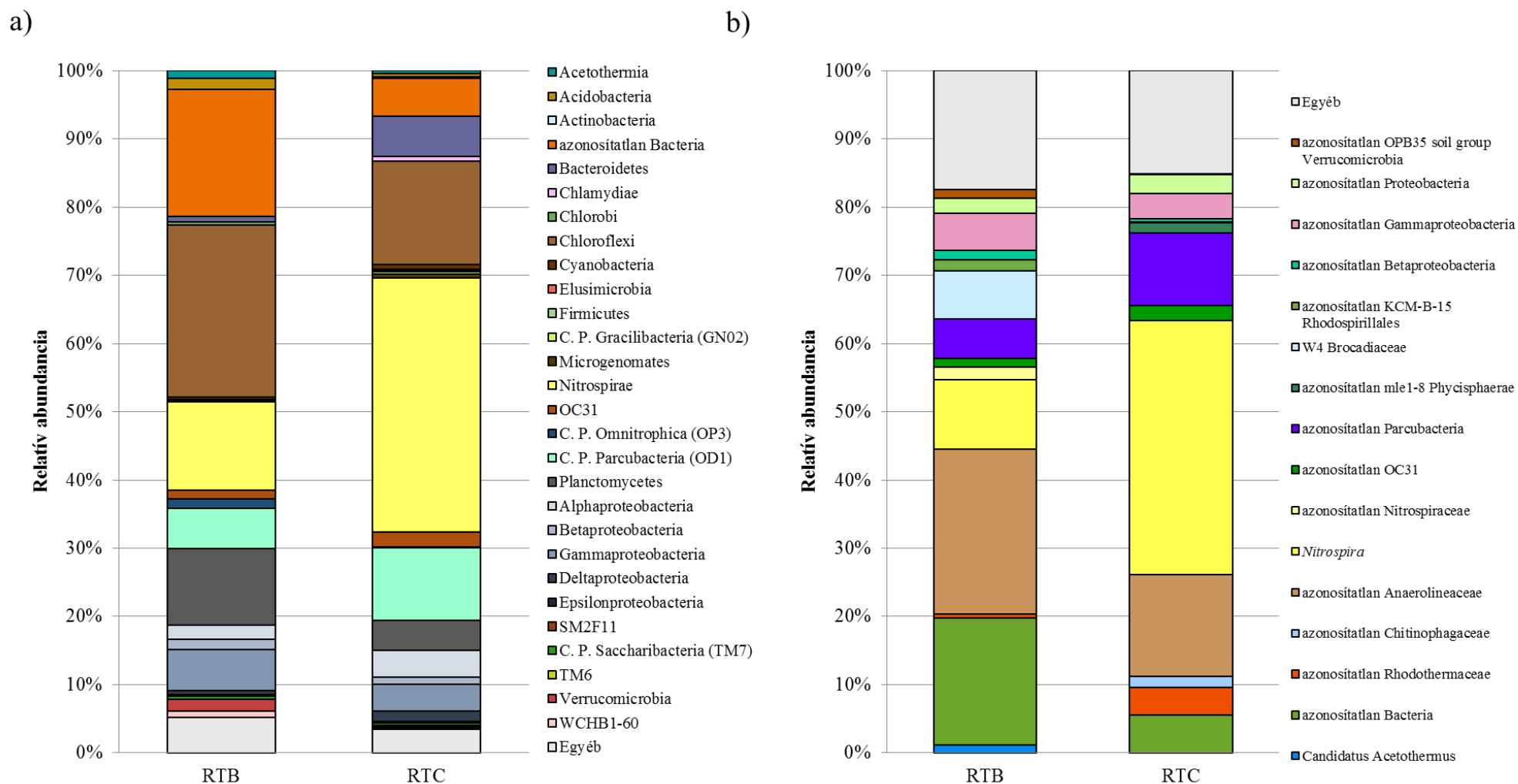
A Rudas-Török-forrásbarlangból a 2014. novemberi mintavételkor 2 mintát dolgoztunk fel piroszekvenálással. A szekvenálás során ez esetben összesen 4398 szekvencia leolvasást

nyertünk. A mintákban a legjelentősebb taxonok az alábbiak voltak: azonosítatlan Bacteria, Chloroflexi, Nitrospirae, Parcubacteria, Planctomycetes és Proteobacteria, különösen az Alphaproteobacteria és Gammaproteobacteria osztályok tagjai (31. a ábra).

A biofilm mintában a legjelentősebb frakciót a Chloroflexi (25%), míg a kalcit mintában a Nitrospirae törzs (37%) adta. Egy a Chloroflexi törzshöz tartozó ismeretlen Anaerolineaceae nemzetség (24% és 14%) és a *Nitrospira* nemzetség (10% és 37%) képviselői mindkét mintában jelentős arányban fordultak elő (31. b ábra).

A biofilm mintában a közösség második legnagyobb frakcióját adó taxon az azonosítatlan Bacteria volt. Az azonosítatlan Bacteria taxon tagjai így szintén nagy arányban (19%) fordultak elő a mintában.

Mind a biofilm, mind a kalcit mintákban jelentősnek bizonyult a Parcubacteria törzs egy a hozzá tartozó azonosítatlan Parcubacteria nemzetség képviselőivel. A Proteobacteria törzsön belül, mely mindkét minta esetében a harmadik legdominánsabb közösségalkotó volt, az Alpha- (azonosítatlan KCM-B-15 Rhodospirillales nemzetség) és Gammaproteobacteria (azonosítatlan Gammaproteobacteria nemzetség) osztályok képviselőit mutattuk ki.

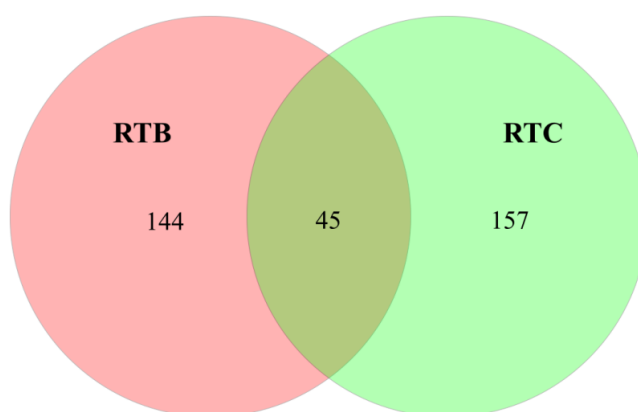


31. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlangból gyűjtött biofilm és kalcit minták piroszekvenálással meghatározott baktériumközösségei
a) törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetében osztályok, illetve b) nemzetség szinten
 Az Egyéb kategóriába a kevesebb, mint 1% relatív abundanciával rendelkező taxonokat soroltam a törzsek és a nemzetségek esetében.

A fajszámbecslő indexek alapján (Sobs, Chao1, ACE) elmondható, hogy a kisebb OTU szám a kalcit mintában volt megfigyelhető. A diverzitás indexek (Shannon és inverz Simpson) az RTC mintában kisebbek voltak, mint az RTB mintában (4. táblázat).

4. táblázat. Az amplikonszekvenálás során kapott bakteriális OTU-k száma, valamint a fajszámbecslő és diverzitás indexek a Rudas-Török-forrásbarlangban
A feltüntetett értékek az adathalmaz újramintavételezésének átlagértékeit jelölik (zárójelben az adott könyvtárból származó összes szekvencia száma látható)

Minta nevek	Szekvenciaszám	Sobs	Chao1	ACE	Shannon	inverz Simpson
RTB	906 (2540)	159	197	201	4,2	32,1
RTC	906 (1858)	160	227	288	3,6	9,6



32. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlangból gyűjtött biofilm (RTB) és kalcit (RTC) mintákat alkotó OTU-k megoszlása Venn-diagramon

A Rudas-Török-forrásbarlangból gyűjtött biofilm mintát 144, míg a kalcit mintát 157 OTU alkotta. A két minta között 45 közös OTU-t találtunk (32. ábra).

6.3. Biofilmképződés tanulmányozása egy *in situ* modellrendszer segítségével a Rudas-fürdő Török-forrásban

6.3.1. A Rudas-Török-forrásbarlang vízkémiai paramétereinek változása egy *in situ* kísérlet folyamán

A 2015. szeptemberben kezdődő Rudas-Török-forrásbarlangban folyó biofilm fejlődésére irányuló *in situ* kísérletben 2016 szeptemberéig a helyszínen mértük a medencevíz pH, hőmérséklet, fajlagos elektromos vezetőképesség és oldott oxigén értékét. Az egy éven át tartó monitorozás során a Rudas-Török-forrásbarlang vizének hőmérséklete 32,7 °C és 37,5 °C között alakult (Függelék 2. ábra). A hőmérséklet 2015. szeptember végétől január végéig folyamatosan csökkent, mely január hónap végére érte el a minimumát, ekkor a

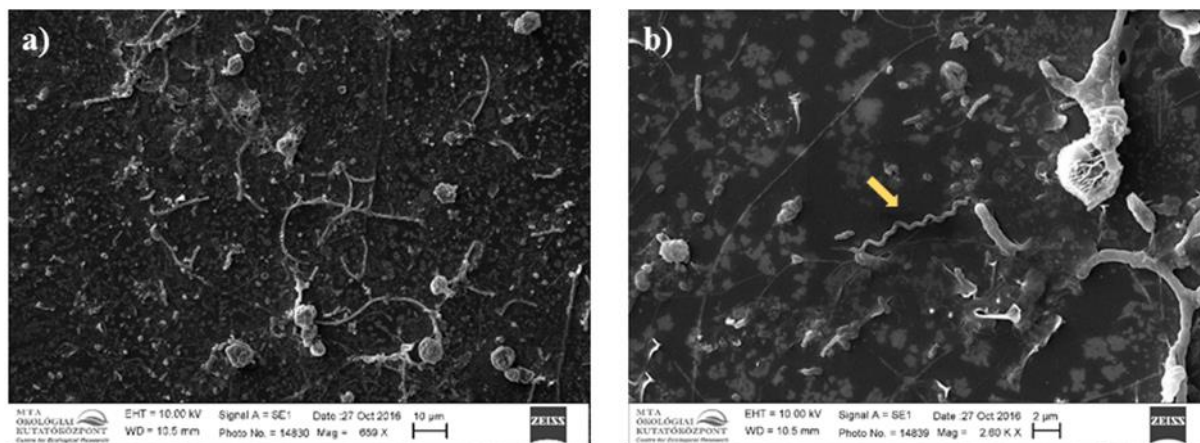
kezdeti 37,4 °C 32,7 °C-ra csökkent. Január végétől egészen 2016 szeptemberéig aztán ismét emelkedés volt tapasztalható.

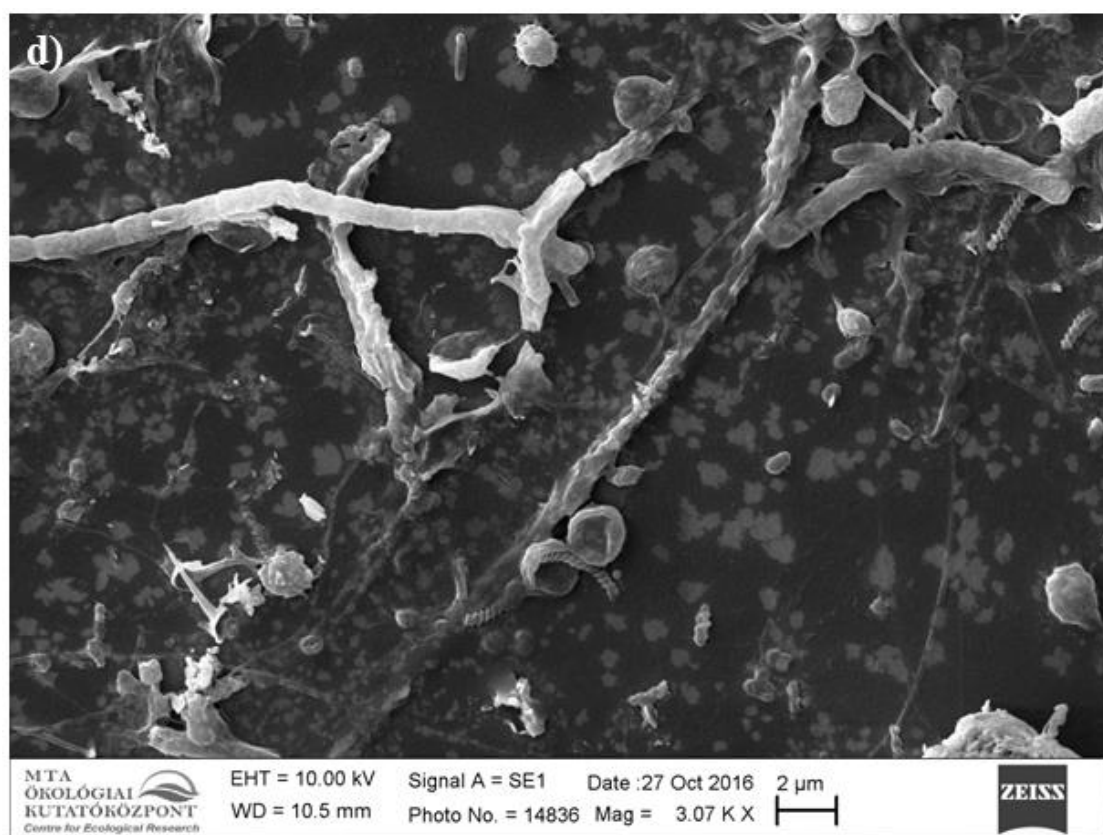
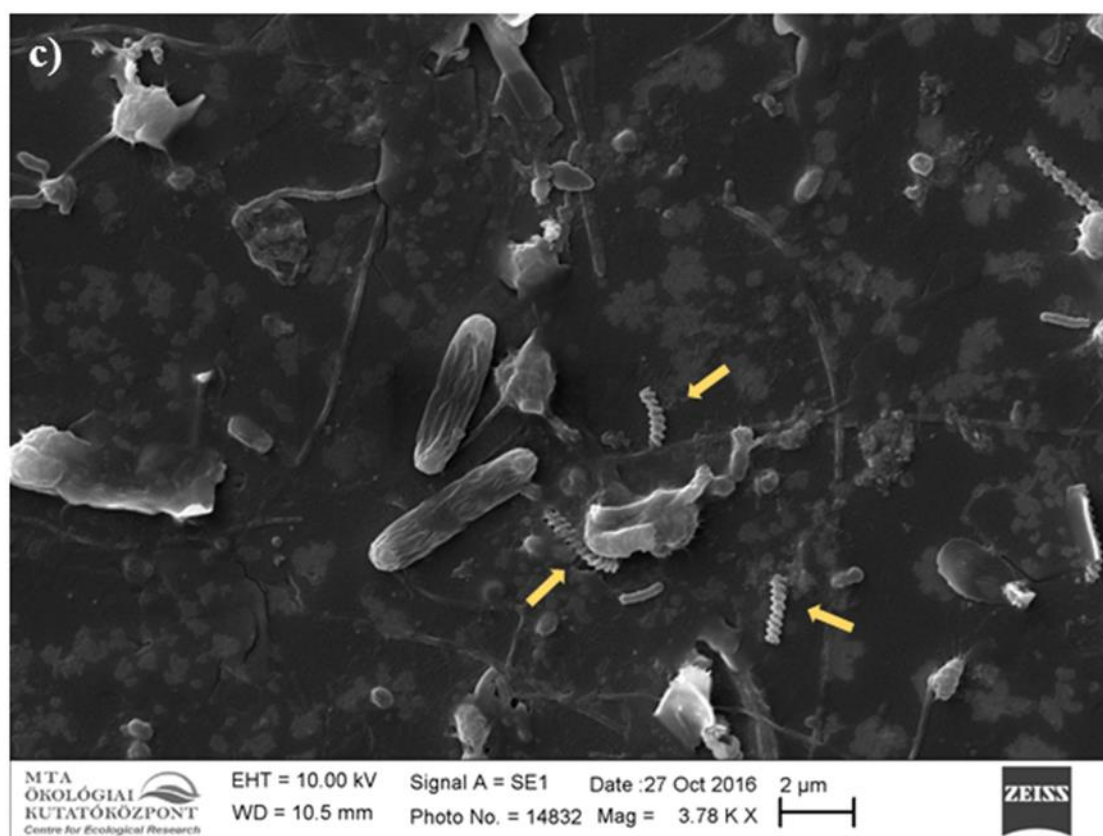
A forrásbarlang vizének pH és oldottoxigén-tartalom változását a Függelékben a 3. ábrán láthatjuk. A pH értékek 6 és 6,58 között alakultak a mérési időszak alatt, míg az oldottoxigén-tartalom 0,23 és 2,38 mg l^{-1} között változott. Az oldott oxigént minden esetben a medence azon pontján mértük, ahová a kémcsőállványt a tárgylemezekkel együtt behelyeztük. Korábbi helyszíni mérések alapján a forrásmedence alján és a vízfelszín közelében eltérő oldott oxigén értékeket mértünk. A helyszíni mérések és a DATAQUA készülék adatai alapján a forrásmedence vízszintje átlagosan 0,5 m volt. A kísérlet kezdetekor a medence alján 0,4 mg l^{-1} , míg a vízfelszín közelében 0,8 mg l^{-1} oldott oxigén értékeket mértünk.

A forrásbarlang vizének fajlagos elektromos vezetőképessége a mért időszak alatt 1672 és 1771 $\mu S/cm$ között változott. A vezetőképesség 2015. szeptembertől egészen 2016. januárig mutatott csökkenést, majd emelkedés volt tapasztalható 2016 szeptemberéig (Függelék 4. ábra).

6.3.2. A Rudas-Török-forrásbarlangban egy *in situ* modellrendszerben kialakult biofilm elektronmikroszkópos vizsgálatának eredményei

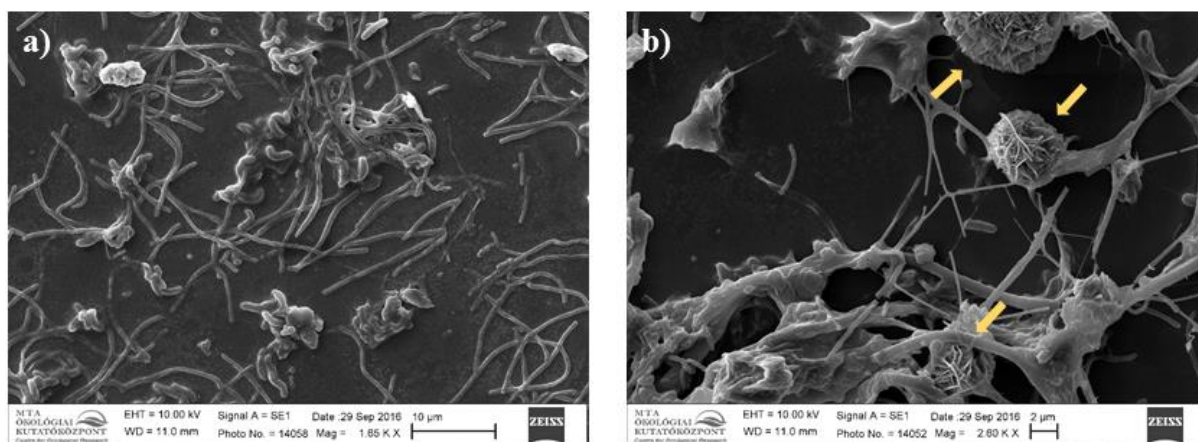
A Rudas-Török-forrásbarlangba kihelyezett tárgylemezeken hétről hétre fejlődő biofilmes mintákat fixálás után EVO MA Zeiss pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk az MTA ÖK Duna-kutató Intézetében. A három hetes (33. ábra) biofilm minta pásztázó elektronmikroszkópos felvételein csak pár, eltérő méretű, sejtsoportot nem képző, zömében fonalas baktérium figyelhető meg. Nagyobb nagyításban csavart alakú baktériumok (33. b ábra) is megfigyelhetők voltak, illetve számos a *Nitrospira* nemzetségre jellemző sejtalakot is sikerült lefényképezni (33. c ábra).





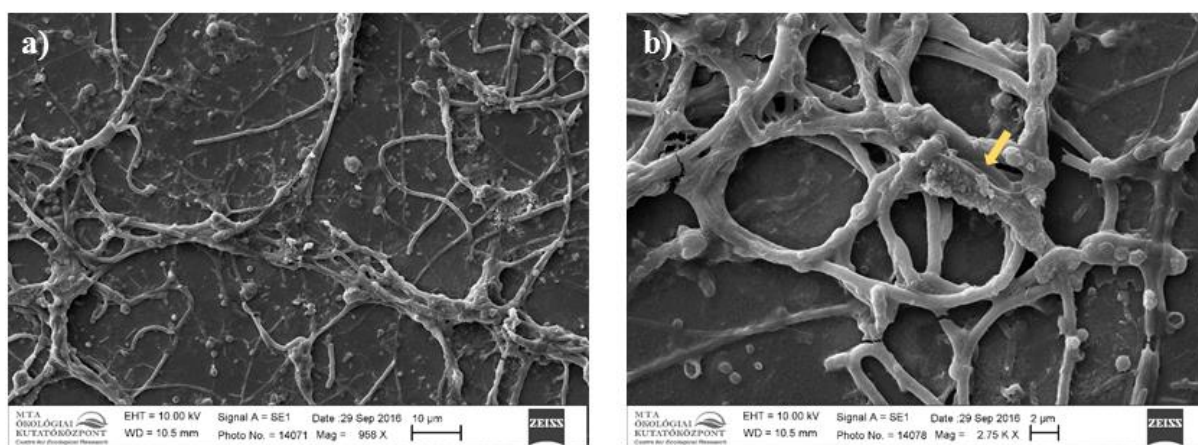
33. ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos felvételek különböző nagyításban a három hetes biofilm mintáról
a) Pár, eltérő méretű, zömében fonalas baktériumok sokasága b) Csavart alakú baktérium
c) Jellegzetes alakú *Nitrospira*-szerű sejtek (sárga nyilak) d) Vastagabb, fonalas alakú mikrobák

A hat hetes biofilm mintáról készült felvételeken (34. ábra) már sokkal több változatos morfológiájú sejtet láthatunk. A fonalas baktériumok tömege mellett egyenes és görbült pálcák is feltűnnek. Nagyobb nagyításban ásványok sokasága is megfigyelhető.

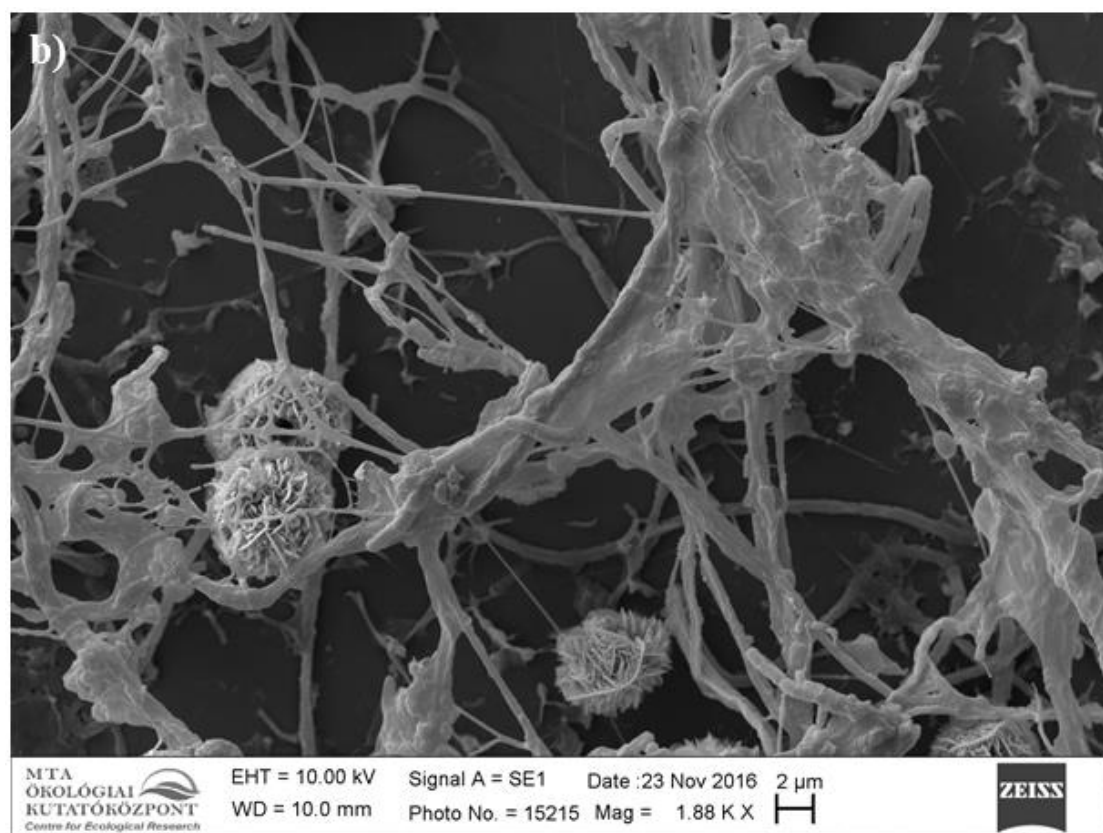
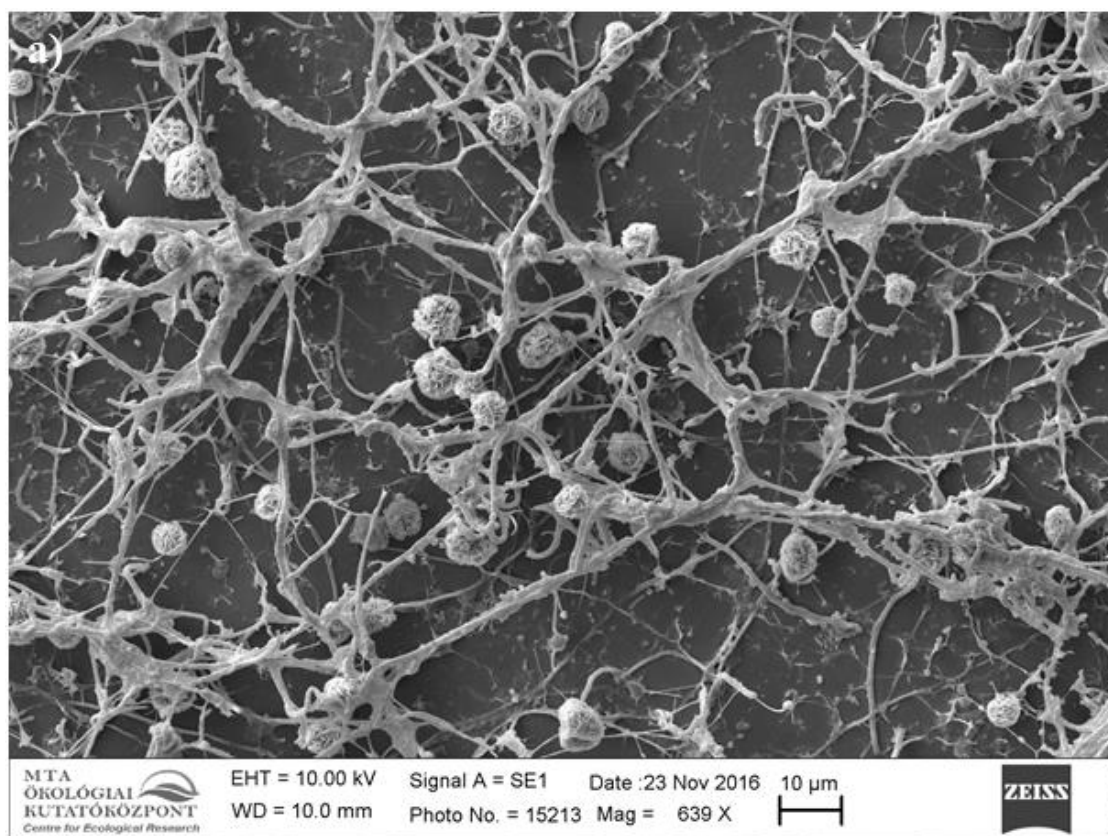


34. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a hat hetes biofilm mintáról
a) Változatos morfológiájú sejtek b) Nagyobb nagyításban ásványok sokasága fedezhető fel (sárga nyilak)

A kilenc hetes biofilm minta esetében egyre több, zömében fonalas morfológiájú sejt figyelhető meg a felvételeken (35. ábra). A különböző vastagságú és kinézetű fonalas baktériumok mellett, számos eltérő méretű, sejtcsoportot képező kokkusz alakú sejtek, illetve egyenes és görbült pálcák is láthatóak nyálkás anyagba ágyazottan, ebbe a nyálkás anyagba különböző ásványi anyagok is felhalmozódhatnak, melyet a sárga nyíl jelez.



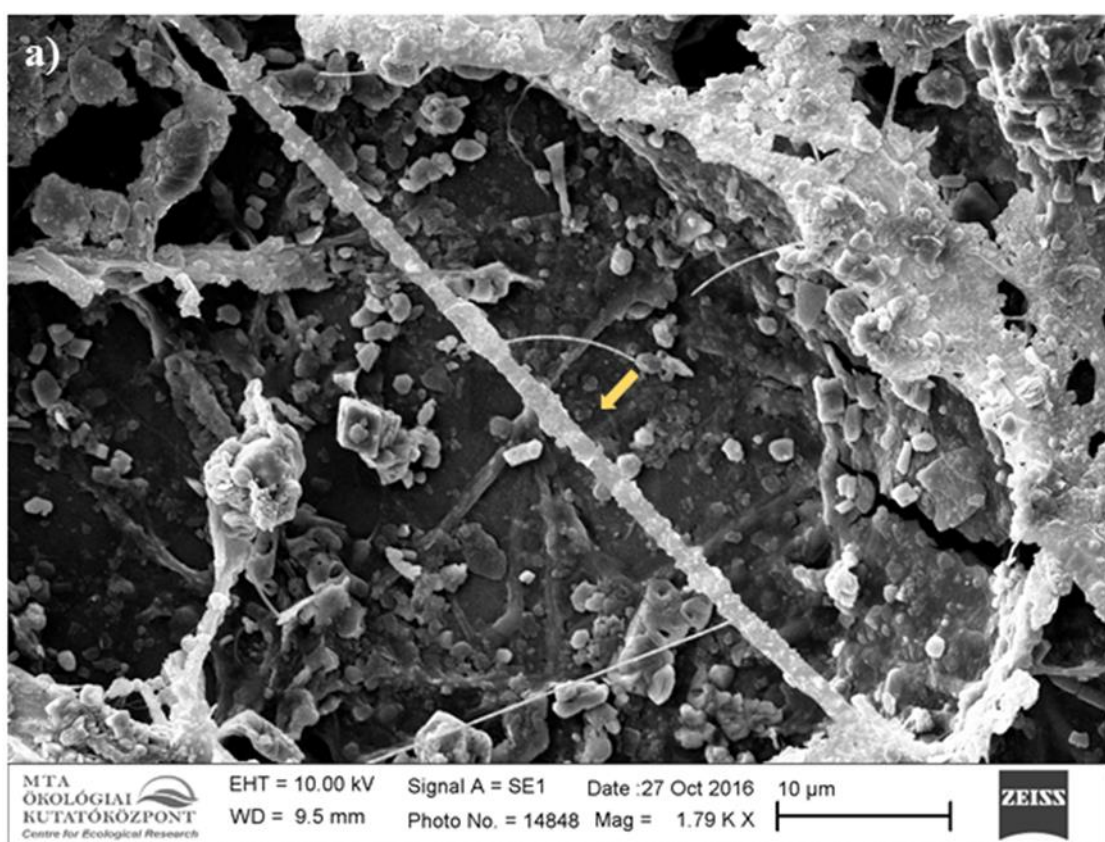
35. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a kilenc hetes biofilm mintáról
a) Különböző vastagságú és kinézetű fonalas baktériumok, illetve kokkusz és pálcá alakú sejtek sokasága b) Nyálkás anyagba ágyazott ásványi anyag (sárga nyíl)

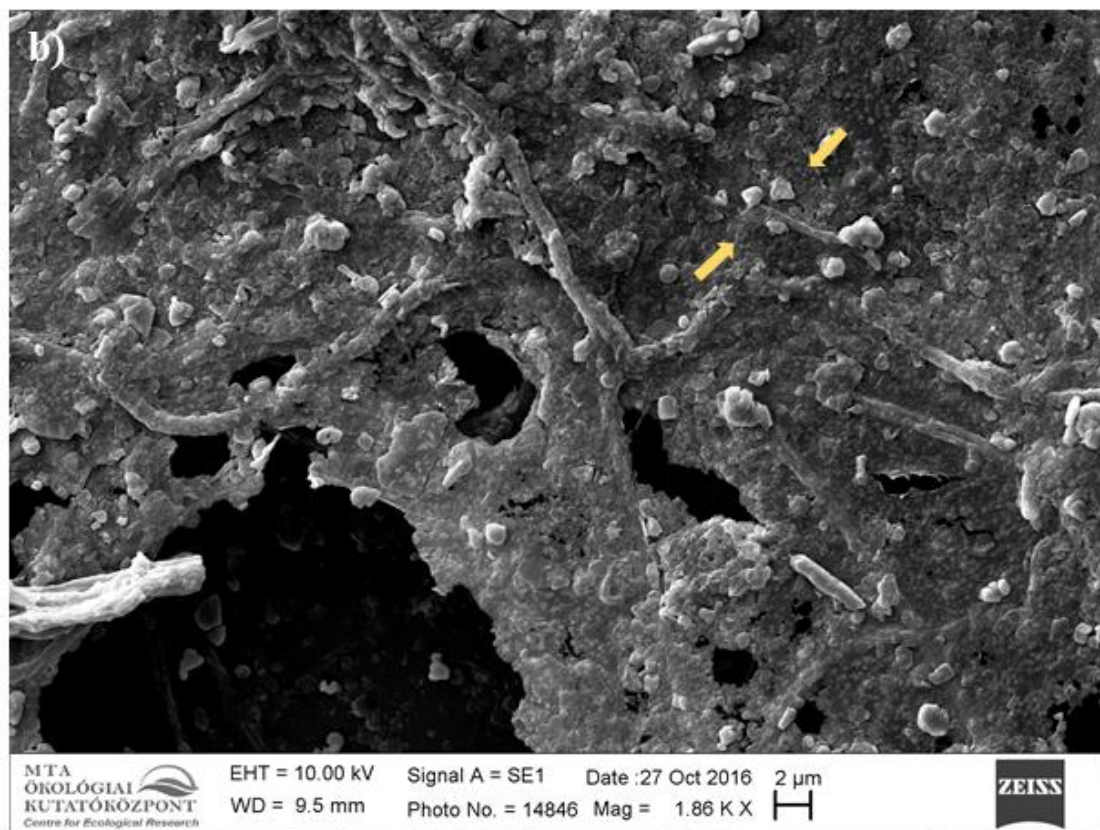


36. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a 12 hetes biofilm mintáról
a) Ásványok a biofilmbe ágyazódva b) A biofilmet alkotó baktériumok által kiválasztott extracelluláris polimer mátrix (EPS)

A tizenkét hetes biofilm mintáról készült SEM felvételeken (36. ábra) is jól megfigyelhetők az ásványok. Nagyobb nagyításban jól látható, hogy a sejtek nyálkás anyagba ágyazottan fordulnak elő. Ez a nyálka a biofilmet alkotó baktériumok által kiválasztott extracelluláris polimer mátrix (EPS).

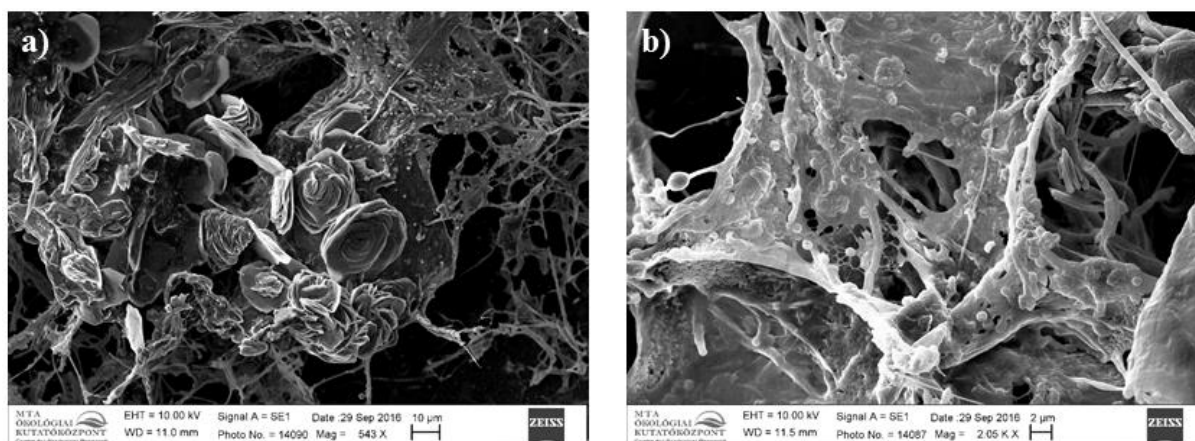
A tizenöt hetes biofilm minták (37. ábra) részletes elektronmikroszkópos vizsgálatai során megfigyelhető, hogy az egyes fonalas baktériumok felszínükön jellegzetes apró gömbök figyelhetők meg (sárga nyilak), melyek feltehetően különböző ásványi anyagok lehetnek. Nagyobb nagyításban szintén számos ásványi anyag, vélhetően kalcium-karbonát, figyelhető meg nyálkás anyagba ágyazottan.





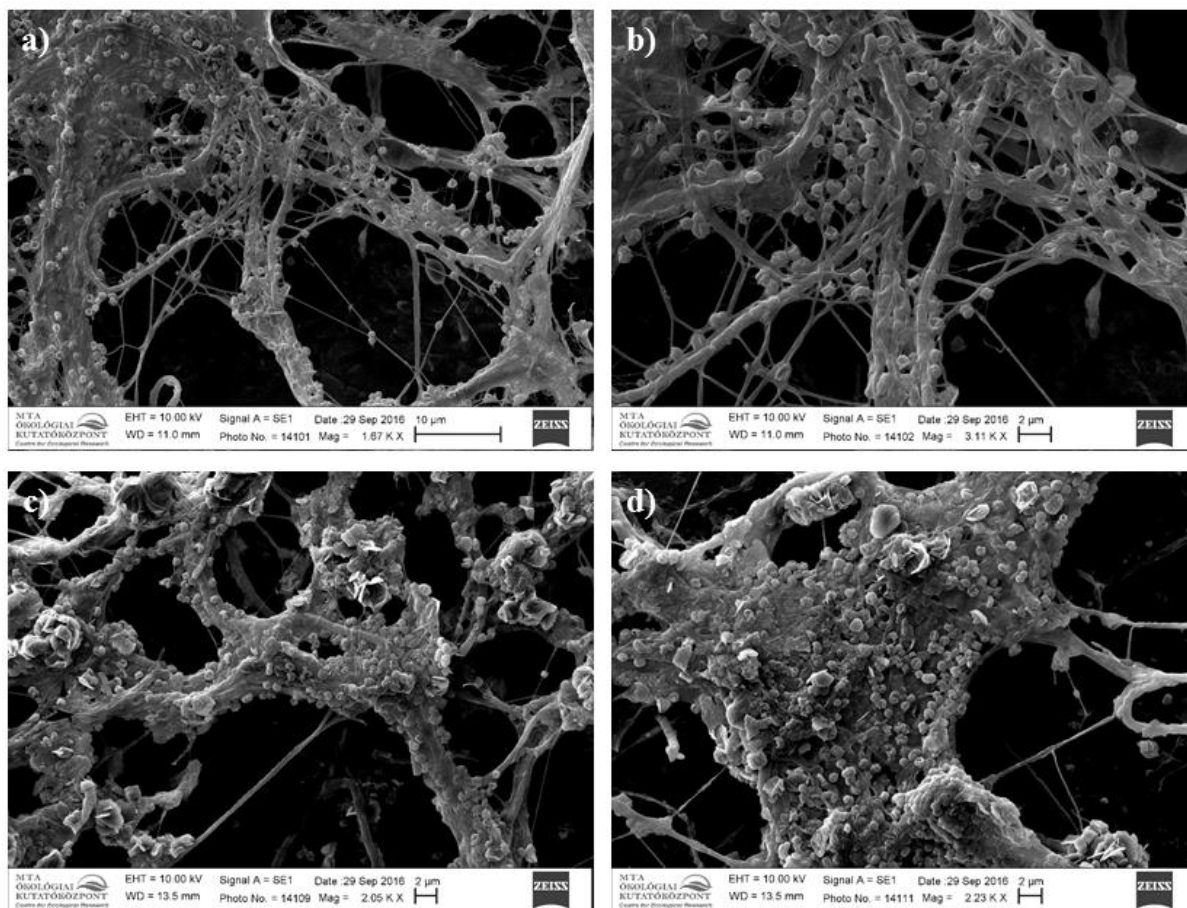
37. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a 15 hetes biofilm mintáról
a) Fonalas baktérium felszínén megfigyelhető ásványi anyagok (sárga nyíl) b) Kalcium-karbonát ásványok nyálkás anyagba ágyazottan (sárga nyilak)

A tizennyolc hetes biofilm mintákról készült felvételeken kisebb nagyításban érdekes rózsza alakú halmazok voltak megfigyelhetők (38. a ábra). Ezen koncentrikus forma, kifelé egyre nagyobb kristálycsoportokkal a barit ásványra jellemzőek. Nagyobb nagyításban szintén jól megfigyelhető a biofilmre jellemző nyálkás anyagú EPS mátrix (38. b ábra).



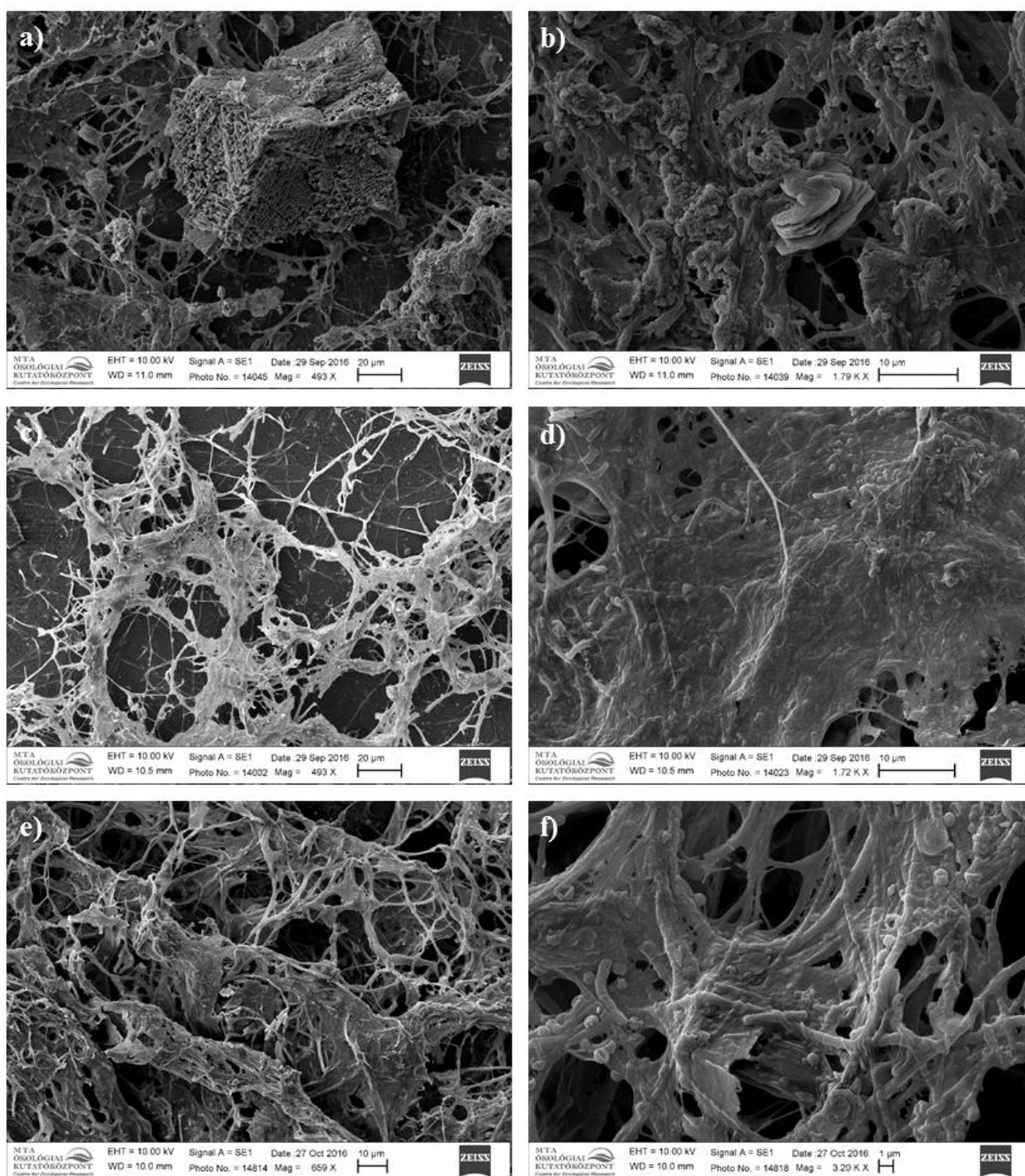
38. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a 18 hetes biofilm mintáról
a) Rózsa alakú barit ásvány b) Biofilmre jellemző EPS mátrix

A huszonegy (39. a és b ábra) és huszonnégy (39. c és d ábra) hetes biofilm pásztázó elektronmikroszkópos felvételein mind kisebb mind nagyobb nagyításban jól látható hálózatos szerkezet figyelhető meg. Hosszanti szálakat láthatunk rövidebb fonalas formákkal összekötve. A felvételeken számos kokkusz alakú sejt is megfigyelhető.



39. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a 21 hetes (a), illetve b) és a 24 hetes c), illetve d) biofilm mintákról

A huszonhét (40. a és b ábra), harminc hetes (40. c és d ábra), illetve egy éves (40. e és f ábra) biofilm mintákról készített pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken különböző vastagságú és kinézetű, zömében fonalas morfológiájú sejtet és ásványokat (pl. rombold alakú kalcit) láthatunk, nagy mennyiségű nyálkás anyagba ágyazottan. Mind a 30 hetes, mind az egy éves biofilm minták esetében jól látható a biofilm hálózatos szerkezete. A hosszanti szálakat keresztben fonalas formák kötik össze hozzájárulva a biofilm komplex szerkezetéhez.



40. ábra. SEM felvételek különböző nagyításban a 27 hetes (a) illetve b)), 30 hetes (c) illetve d)) és az egy éves (e) illetve f)) biofilm mintáról

6.3.3. A Rudas-Török-forrásbarlangban egy *in situ* modellrendszerben képződött biofilm baktériumközösségeinek fajszámbecslő és diverzitás indexei

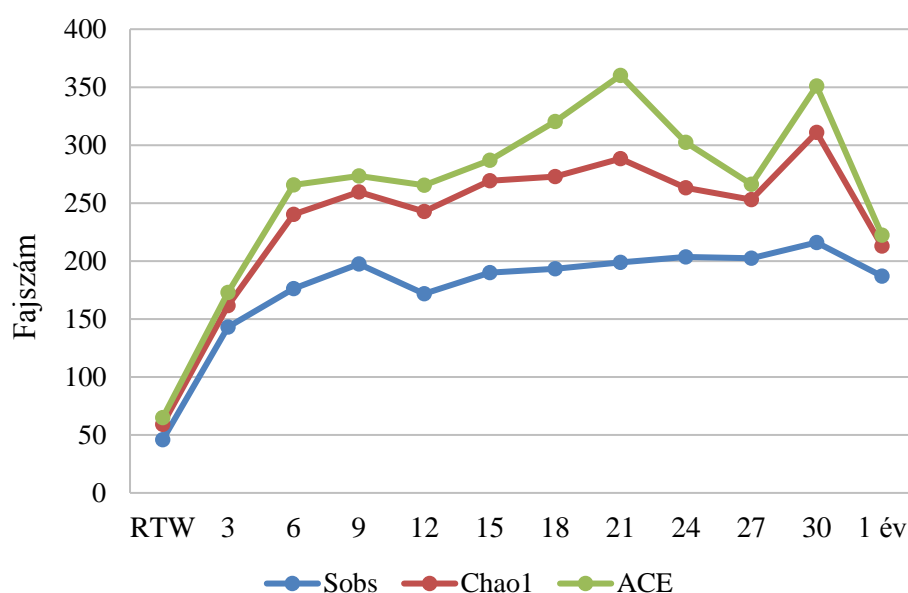
A fajszámbecslő indexek értékei, így a Sobs (OTU szám), Chao1 (Chao1 index), illetve ACE (gyakoriság alapú lefedettség becslő index) a vízmintában, illetve a harmadik, a hatodik és a tizenkettedik heti biofilm mintákban voltak a legalacsonyabbak (5. táblázat).

5. táblázat. Az amplikonszekvenálás során kapott bakteriális OTU-k száma, valamint a fajszámbecslő és diverzitás indexek a Rudas-fürdő Török-forrásában végzett *in situ* modellrendszer biofilm és vízmintáinak kapcsán.

A feltüntetett értékek az adathalmaz újramintavételezésének átlagértékeit jelölik (zárójelben az adott könyvtárból származó összes szekvencia száma látható)

Minta nevek	Szekvenciaszám	Sobs	Chao1	ACE	Shannon	inverz Simpson
RTW	2954 (6536)	46	59	65	0,4	1,1
3	2954 (2954)	143	162	173	3,5	17,1
6	2954 (9010)	176	240	266	3,3	10,5
9	2954 (5986)	198	260	273	3,8	17,4
12	2954 (7291)	172	243	265	3,6	17,4
15	2954 (13152)	190	269	287	3,6	14,1
18	2954 (8225)	193	273	320	3,7	17,8
21	2954 (8555)	199	288	360	3,7	14,6
24	2954 (5102)	204	263	302	3,8	18,3
27	2954 (4800)	202	253	266	3,8	18,9
30	2954 (8352)	216	311	351	4,0	25,6
1 év	2954 (3431)	187	213	222	3,9	23,7

A legkisebb fajszámot is így a vízmintából és a 3, 6 és 12 heti mintákból, míg a legmagasabb fajszámot a 30. heti biofilm mintából mutattuk ki (41. ábra).



41. ábra. Fajszámbecslő indexek alakulása a Rudas-fürdő Török-forrásában végzett *in situ* modellrendszer biofilmjeinek kapcsán

A diverzitás indexek értékei, így a Shannon és az inverz Simpson indexek alapján elmondható, hogy mind a Shannon, mind az inverz Simpson indexek a vízmintában voltak a legkisebbek, míg a biofilm érése során növekedtek (kivétel a 6. hét).

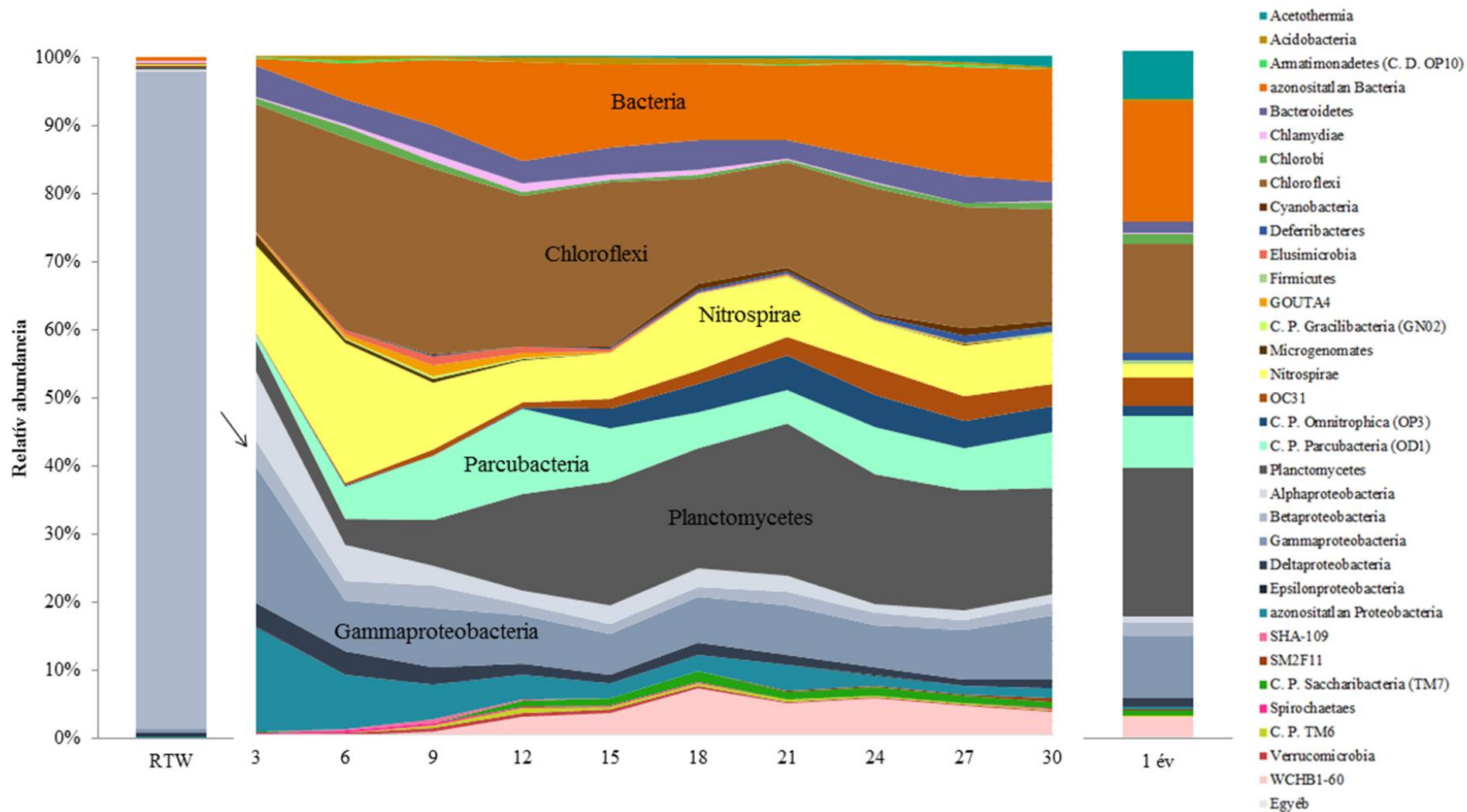
6.3.4. A Rudas-Török-forrásbarlangban egy *in situ* modellrendszerben fejlődött biofilm amplikonszekvenáláson alapuló vizsgálatának eredményei

A 2015 szeptemberében kezdődött kísérlet során gyűjtött 12 minta (3 hetenként biofilm mintákat, 1 éves biofilm mintát, illetve vízmintát gyűjtöttünk) 16S rRNS gén amplikon piroszekvenálása során összesen több mint 88000 szekvencia azonosítását végeztük el, melyeket 34 filogenetikai törzsbe soroltunk. A taxonómiai diverzitás a 3. héttől nem mutatott növekedést, maximumát ekkor érte el. A domináns biofilm alkotók az azonosítatlan Bacteria, Chloroflexi, Parcubacteria, Planctomycetes, Proteobacteria, Nitrospirae és WCHB1-60 törzsek voltak, melyek relatív abundanciája különböző mértékben változott a vizsgált időszakban (42. ábra). Néhány taxon (azonosítatlan Anaerolineaceae) végig dominánsnak bizonyult egészen a kolonizáció kezdeti szakaszától, azonban más nemzetségek (pl. azonosítatlan Parcubacteria, azonosítatlan WCHB1-60, azonosítatlan Proteobacteria) abundanciája fluktuációt mutatott (43. ábra).

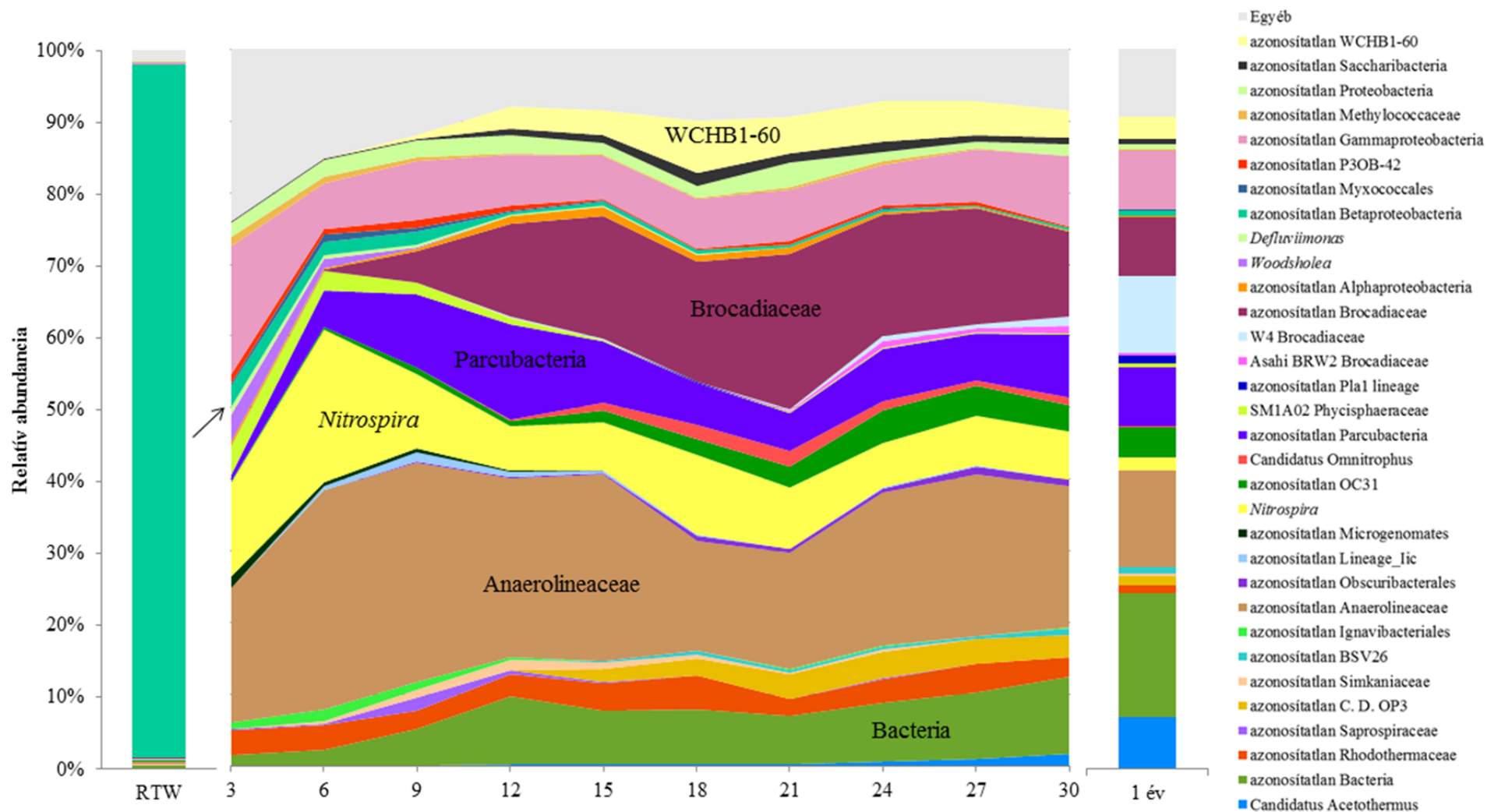
Az azonosítatlan Bacteria domén relatív abundanciája 1,2% és 17,4% között alakult a biofilm minták esetében. Az azonosítatlan Bacteria taxon relatív abundanciája szintén hasonlóképpen alakult. A legalacsonyabb a 3 hetes, míg a legmagasabb érték az 1 éves biofilm mintára volt jellemző, így a törzs abundanciájának jelentős mértékű növekedéséről beszélhetünk mind törzs, mind nemzetség szinten (42-43. ábra). A vizsgált időszakban a Chloroflexi törzs végig dominánsnak bizonyult átlagosan 20%-os relatív abundanciával. A törzshöz tartozó azonosítatlan Anaerolineaceae taxon abundanciája a vizsgált időszakban 13% és 31% között alakult. A *Nitrospira* nemzetség (Nitrospirae törzs) az egy éves vizsgált időszak alatt a 6. héten bizonyult a legdominánsabbnak (21%), míg az egy éves biofilm minta esetében 2% volt a nemzetség relatív abundanciája. A Parcubacteria törzs esetében a 12. héten azonosítottuk a legmagasabb (13%), míg a 3. héten a legalacsonyabb relatív abundancia értéket (1%). A vizsgált időszak alatt így a törzs abundanciája kismértékű növekedést mutatott. A Planctomycetes törzs relatív abundanciája jelentősen nőtt az egy év alatt, míg a WCHB1-60 törzs a 18. héten volt a legabundánsabb, jöllehet a törzs képviselői az első hat héten szinte teljesen hiányoztak. A Planctomycetes törzshöz tartozó azonosítatlan Brocadiaceae nemzetség a 21. héten volt a legdominánsabb (22%). A Proteobacteria törzs tagjai nagy számban voltak megtalálhatóak a biofilm mintákban, azonban osztály szintjén már

jelentős mértékben változott relatív abundanciájuk a vizsgált időszakban. A legszembetűnőbb változás a Gammaproteobacteria osztály esetében mutatkozott. Az osztály képviselői a kezdeti időszakban voltak dominánsak és arányuk az egy év elteltével jelentősen csökkent.

A vízmintában szinte kizárólag a Betaproteobacteria osztály tagjai voltak megtalálhatóak 97%-os relatív abundanciával. A Betaproteobacteria osztály képviselői ugyan a biofilm mintában is kimutathatók voltak, de csak meglehetősen kis relatív abundanciával (1-4%). A vízmintában szinte kizárólag egyetlen OTU (OTU4 – azonosítatlan Betaproteobacteria) volt megtalálható, ez az OTU a többi mintában teljesen hiányzott. Mivel a mintában szinte kizárólag ez az egyetlen OTU volt jelen, ezért Sanger szekvenálással is megfuttattuk ezt a mintát. Az OTU4 bázissorrendjét a tiszta kromatogram alapján határoztuk meg, mely 93%-os szekvenciaegyezést mutatott a kén-oxidáló *Sulfuritortus calidifontis* baktériumfajjal.



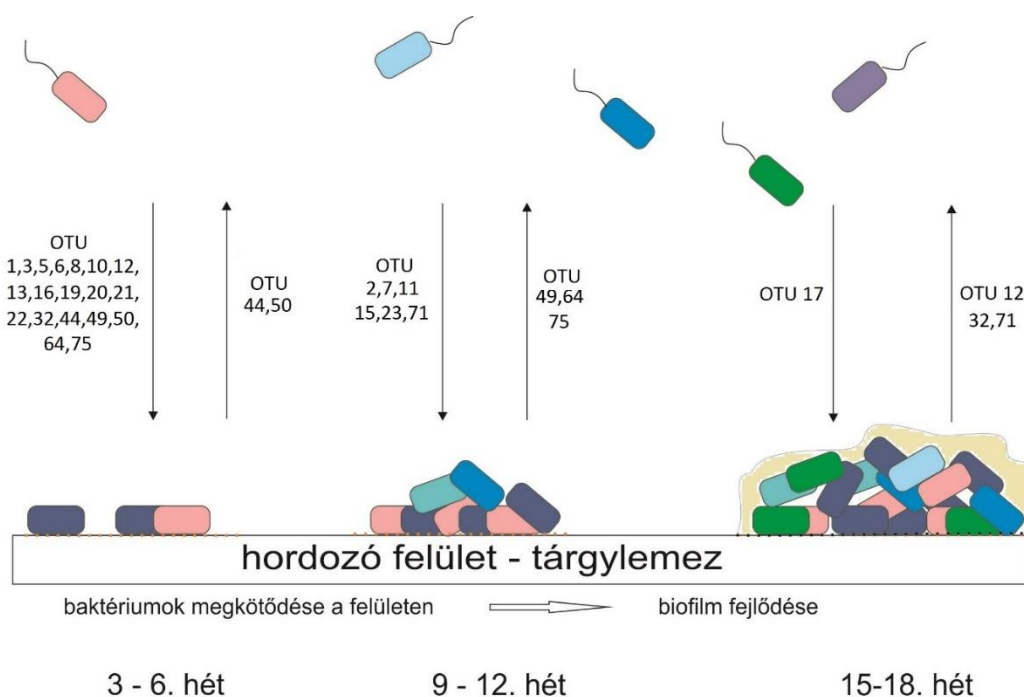
42. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlangban végzett *in situ* modellrendszer víz és biofilm mintáinak piroszekvenálással meghatározott baktériumközösségei törzsek, illetve a Proteobacteria törzs esetén osztály szinten
Az Egyéb kategóriába a kevesebb, mint 1% relatív abundanciával rendelkező taxonokat soroltam.



43. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlangban végzett *in situ* modellrendszer víz és biofilm mintáinak piroszekvenálással meghatározott baktériumközösségei nemzetség szinten

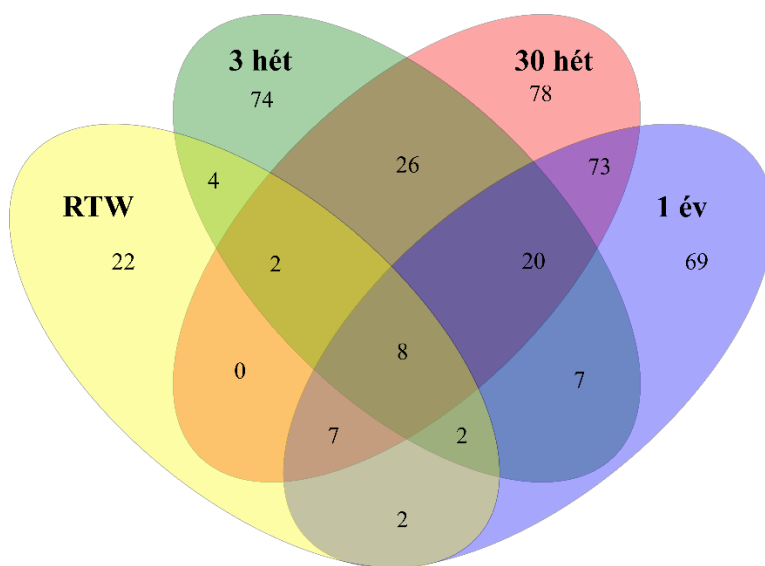
Az Egyéb kategóriába a kevesebb, mint 1% relatív abundanciával rendelkező taxonokat soroltam.

A vizsgált egy éves időszakban a biofilmekben OTU szinten dinamikus változásokat figyeltünk meg (44. ábra). Bizonyos OTU-k csak a vizsgált időszak elején voltak jelen (OTU12 – azonosítatlan Proteobacteria) vagy csak a vizsgált időszak elején voltak dominánsak, aztán kevésbé (OTU3 – Nitrospira, OTU21 – azonosítatlan Gammaproteobacteria), bizonyos OTU-k pedig csak később jelentek meg. A 9. héttől jelent meg az OTU2 – Brocadiaceae, az OTU7 – azonosítatlan WCHB1-60, illetve az OTU15 – azonosítatlan Parcubacteria, melyek közül az OTU2 és az OTU7 egyre dominánsabbak is lettek. Szintén a 9. héttől volt kimutatható az OTU11 – azonosítatlan Bacteria, az OTU23 – azonosítatlan OC31 illetve az OTU71 – Saprospiraceae is. A 15. héten jelent meg az OTU17 – C. D. OP3. Az OTU44 (Woodsholea) illetve az OTU50 (Methylococcaceae) a 9. héttől már egyáltalán nem voltak kimutathatóak a biofilm mintákból. Az OTU49 (azonosítatlan Ignavibacteriales), az OTU64 (azonosítatlan Gammaproteobacteria) és OTU75 (azonosítatlan Parcubacteria) a 12. héttől, míg az OTU12 (azonosítatlan Proteobacteria), OTU32 (SM1A02 Phycisphaeraceae) illetve OTU71 (Saprospiraceae) a 18. héttől tűntek el teljesen a biofilmből. Összességében az OTU1 (Anaerolineaceae) és az OTU2 (Brocadiaceae) bizonyultak dominánsnak a vizsgált időszak alatt.



44. ábra. A fejlődő biofilmben megfigyelhető OTU szintű dinamikus változások (a lefelé mutató nyilak az adott héten megjelenő OTU-kat ábrázolják, míg a felfelé mutató nyilak azt jelzik, hogy az adott OTU az adott héttől már nem volt kimutatható a biofilm mintákban)

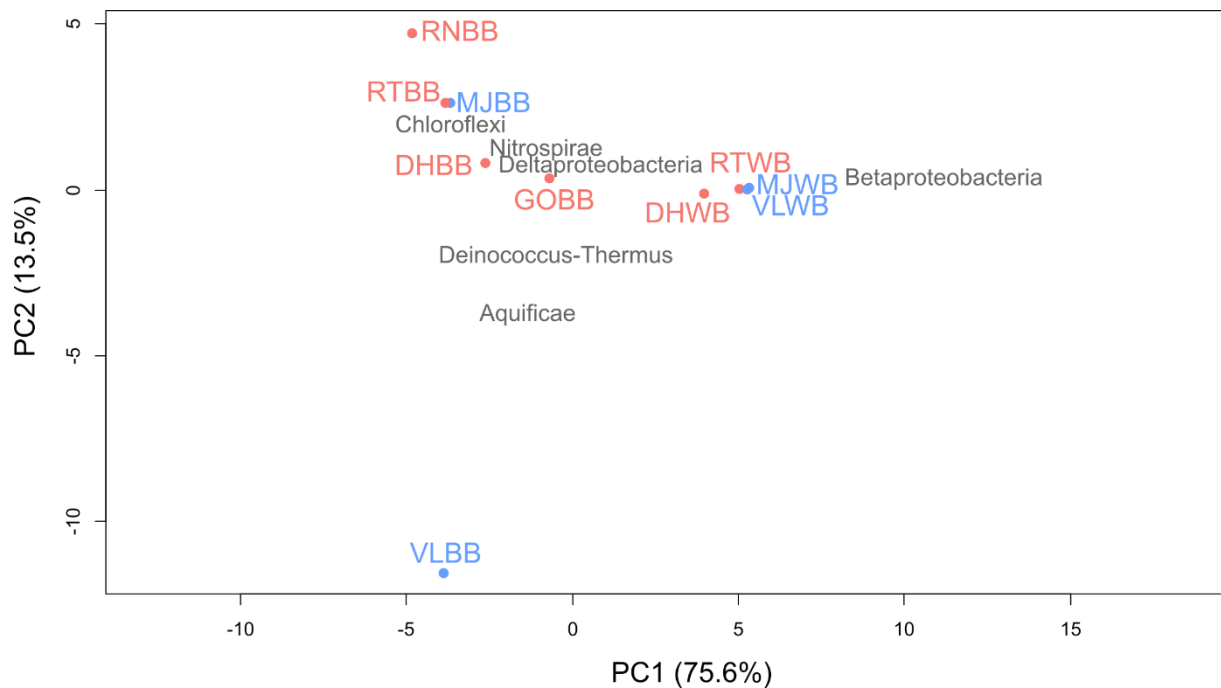
A fejlődő és a már érett biofilm, illetve a vízmintát alkotó OTU-k Venn-diagramon való ábrázolása alapján jól látható, hogy a három hetes biofilmet 143 OTU, a 30 heteset 214, míg az egy éves biofilmet 187 OTU alkotta (45. ábra). A vízmintában ellenben 47 OTU volt megtalálható. A három hetes és az egy éves biofilm között 37, míg a víz és a három hetes biofilm között 16 közös OTU-t találtunk. Számos OTU csak egy-egy adott mintára, csak a fejlődő, vagy csak az érett biofilmre volt jellemző.



45. ábra. A tárgylemezeken fejlődő, az érett illetve a vízmintákat alkotó OTU-k megoszlása Venn-diagramon

6.4. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz-, biofilm-, kalcit- és üledék baktériumközösségeinek részletes összehasonlító elemzése

A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok molekuláris klónozással elemzett mintáinak összehasonlítása céljából főkomponens analízist készítettünk az egyes mintavételi helyeken előforduló taxonok relatív abundancia viszonyai alapján (46. ábra). A két főkomponens a minták összvarianciájának mintegy 89%-át magyarázta.

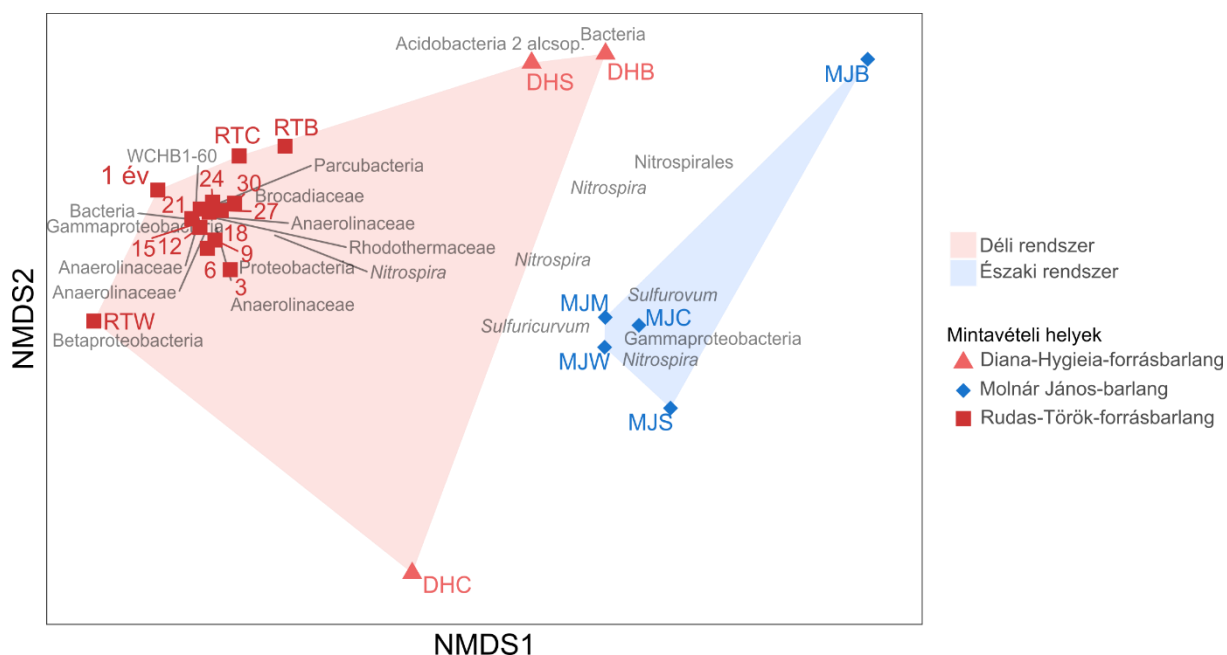


46. ábra. A BTK északi (kék) és déli (piros) rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz és biofilm mintáinak főkomponens analízisen alapuló ábrája a klontárak alapján
A minták közti különbség 80%-áért felelős törzseket, illetve a Proteobacteria törzs esetén osztályokat szürke színnel tüntettük fel.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy a vízminták és a biofilm minták külön csoportosultak mindkét rendszer esetében. A víz minták szignifikánsan elkülönültek a biofilm mintáktól, viszont a két rendszer nem különült el egymástól a varianciaanalízis alapján. Az északi és déli rendszerhez tartozó víz minták is nagyon hasonlóak voltak, leginkább a déli rendszerhez tartozó Diana-Hygieia-forrásrendszer vize különült el a többi forrás, illetve forrásbarlang vizétől. Az elválásban szerepet játszó domináns közösségalkotók a Betaproteobacteria osztály képviselőivel mutatták a legnagyobb szekvenciaegyeztést. A biofilm minták tekintetében azonban már nagyobb különbségeket vehetünk észre. Legjobban a déli rendszerhez tartozó Rudas-Török-forrásbarlang falán található biofilm minta hasonlított az északi rendszerhez tartozó Molnár János-barlang falain található vöröses-barna biofilm mintához. A második főkomponens mentén leginkább elkülönülő Városligeti kút biofilmjének domináns közösségalkotói az Aquificae és a Deinococcus-Thermus törzsekhez sorolható szekvenciák voltak. A GOBB, DHBB, RTBB, MJBB és RNBB minták csoportosolását a Chloroflexi, Nitrospirae, Acidobacteria, illetve Deltaproteobacteria törzsek és osztály jelenléte magyarázta.

A BTK piroszekvenálással elemzett mintáinak összehasonlításához NMDS elemzést végeztünk (47. ábra). A Past programmal végzett Simper-teszt alapján a minták közti

különbségek 40%-áért felelős OTU-khoz tartozó taxonokat jelenítettük meg. A varianciánálízis alapján jól elkülönült egymástól az északi, illetve a déli rendszer, azonban jól elkülönültek egymástól az egyes mintavételi helyek (Molnár János-barlang, Diana-Hygieia-forrásbarlang és Rudas-Török-forrásbarlang) is. A Rudas-Török-forrásbarlang egyes mintái szorosan egy csoportot alkottak, bizonyítva azt, hogy a bakteriális közösség szerkezet ezen minták esetében nagyon hasonló. Érdekes, hogy a Rudas-Török-forrásbarlang kőzetén évek óta fejlődő biofilm minta (RTB), illetve a tárgylemezeken egy év alatt fejlődő biofilm minták az ábrán szintén közel helyezkednek el egymás mellett, ami alapján jól látható, hogy hasonló a minták közösség szerkezete. Az RTB és 3-30, illetve 1 éves biofilm minták domináns közösségalkotói is megegyeztek, nem mutatott eltérést, szelekciót a tárgylemez és a kőzet, mint hordozó felület. A Rudas-Török-forrásbarlang medencéjének felületén található kalcit minta is jól illeszkedett a többi, Rudas-Török biofilm minta közé. A biofilm mintáktól jól elkülönült az RTW minta, mely elválásért a mintában egyeduralkodó Betaproteobacteria (OTU4 – azonosítatlan Betaproteobacteria) felelős.



47. ábra. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz, biofilm, kalcit és üledék baktériumközösségeinek Bray-Curtis hasonlóságon alapuló NMDS analízise (stressz: 0,09)

A minták közti különbségek 40%-áért felelős bakteriális OTU-khoz tartozó legközelebbi taxonokat szürke színnel jelöltük.

A Diana-Hygieia-forrásbarlang mintái ellentétben a Rudas-fürdő Török-forrásának mintáitól, már nem alkotnak szoros csoportot. Érdekes, hogy a kalcit minta jól elkülönült a biofilm és üledék mintáktól. A DHB és DHS minták viszont hasonlóan bizonyultak. A

Simper-teszt alapján végzett, a minták közti különbségek 40%-áért felelős OTU-khoz tartozó taxonok közül azonban csak a DHB minta esetében látunk az ábrán is feltüntetett taxont, ami alapján elmondható, hogy nem lehet a különbség okaként egy-egy taxont megjelölni. A DHB minta elválásáért az *Acidobacteria* 2-es alosportja felelős, mely nagy arányban volt megtalálható a mintában.

A Molnár János-barlang víz és üledék mintái szintén jól elkülönültek a többi mintától és közel helyezkedtek el egymás mellett az elemzésben. A biofilm minta azonban elkülönült a többi Molnár János-barlang mintától. A meleg és kevert vizek esetében a *Sulfuricurvum* és *Sulfurovum* nemzetségek, a hideg vízben a Gammaproteobacteria osztály és *Nitrospira* nemzetség, míg a biofilm mintában a *Nitrospira* nemzetség és Nitrospirales rendhez tartozó OTU-k voltak leginkább felelősek a minták közti különbségért.

7. Eredmények értékelése

7.1. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok víz és biofilm prokarióta közösségeinek összetétele a 2012-es mintavétel során

7.1.1. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó vizek környezeti paraméterei

A hipogén karsztosodás típusterületének tekinthető BTK (északi és déli megcsapolódási rendszerek) forrásainak és forrásbarlangjainak vizét alapvetően az áramlási rendszerek és azok a kőzetek határozzák meg, melyekkel azok útjuk során kölcsönhatásba lépnek. Ezek a vizek a Dunántúli-középhegységben szivárognak a felszín alá, ahol a mélyben felmelegsznek és oldják a középhegység karbonátját, ami összefüggésbe hozható a vizek magas oldottanyag-tartalmával. A BTK vizeire minden esetben alacsony teljes szerves szénmennyiség volt jellemző, melyek a vizek oligotróf jellegére utalnak. A vizek hőmérséklete alapvetően a mezofil mikroorganizmusoknak kedvez, melyek 25-45 °C hőmérsékleti optimummal rendelkeznek. A Városligeti kút magas, 74 °C-os hőmérsékletén viszont csak termofil mikroorganizmusok (45-60 °C hőmérsékleti optimum) fordulnak elő. A kísérő anionok alapján a forrásvizekre, különösen a déli rendszer vizeire, magas szulfát és kloridion koncentrációk voltak jellemzőek. Utóbbi nem tipikus karsztvíz komponens, megnövelt többletüket a medence felől érkező fluidumok okozzák (Erőss és mtsai, 2012; Mádl-Szőnyi és Tóth, 2015). A BTK forrásainak és forrásbarlangjainak vizeire jellemző főbb fizikai és kémiai paraméterek változásának főkomponens analízise alapján a déli rendszerhez tartozó források külön csoportot alkottak, azonban az északi rendszerhez tartozó Molnár János-barlang és Városligeti kút vizei jelentősen eltértek egymástól és a déli rendszer vizeitől is. Ez összhangban áll a korábbi megfigyelésekkel is, miszerint a BTK területén nemcsak a fedetlen karszt határozza meg a kémiai-geokémiai karaktert, hanem a fedett karszt és a fedőn átszivárgó vizek is fontos szerepet tölthetnek be a források fizikai-kémiai paramétereinek alakulásában. A felszín alatti keveredés édes és sós víz között a felszín alatti vízmozgás által meghatározott, melyre Mádl-Szőnyi (2015) mutatott rá. A BTK így több szempontból is meglehetősen különleges, extrém élőhelyet nyújt az itt megtalálható prokarióta közösségek számára.

7.1.2. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok mikrobaközösségeinek diverzitása

A BTK területéről származó biofilm minták molekuláris klónozással való elemzése során, ellentétben a vízmintákkal, meglehetősen nagyfokú diverzitást tártunk fel. Ez összhangban áll a biofilm mintákról készült nagy felbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételekkel, melyeken jól látható, hogy a biofilmeket képező baktériumok nagyon változatos morfológiával rendelkeztek. A különböző kalcium-karbonát ásványok meglehetősen jó kolonizációs felszínként szolgálnak a baktériumok számára, amelyek az egyes forrásbarlangokban sok helyen szabad szemmel is jól látható biofilmek kialakulásához vezetnek. A hosszú, fonalas baktériumok által alkotott hálózatos jellegű biofilm szintén minden mintavételi hely esetében megfigyelhető volt, akárcsak az EPS jelenléte. A molekuláris klónok nagy része hasonló környezetekből származó élőhelyek (pl. barlangi különböző mikrobiális biofilmek, karsztvizek, hőforrások) környezeti klónjaival mutatta a legnagyobb mértékű szekvenciaegyezést. Faji vagy nemzetség szintű azonosításra azonban a legtöbb esetben a meglehetősen kicsi szekvenciahasonlóság (kevesebb, mint 95%-os bázissorrendbeli egyezés) miatt nem volt lehetőségünk.

A biofilm minták baktériumközösségeiben a Chloroflexi, a Nitrospirae, a Proteobacteria és az Aquificae törzsek képviselői voltak dominánsak, bár ezen törzsek eloszlása mintánként meglehetősen eltért. A déli rendszer mintáiban, illetve a Molnár János-barlang esetében nagyobb taxonómiai diverzitást tártunk fel, ellentétben a szintén északi rendszerhez tartozó Városligeti kúttal.

A Chloroflexi törzs tagjai a legnagyobb szekvenciaegyezést a termofil, kemoheterotróf *Ardenticatena maritima* fajjal (Ardenticatenales rend) mutatták, melyet egy vasban gazdag hidrotermális területéről írtak le először Japánból (Kawaichi és mtsai, 2013). A fajnak a vasvegyületek átalakításában is szerepe lehet (Kawaichi és mtsai, 2018). A fakultatív anaerob és a szigorúan anaerob anyagcserét folytató, fonalas szerveződésű *Thermoflexus hugenholtzii* (Thermoflexales rend) és *Bellilinea caldifistulae* (Anaerolineales rend) fajokkal mutattak még nagy hasonlóságot klónjaink, utóbbi a törzs szigorúan anaerob anyagcserét folytató, fonalas szerveződésű, kemoorganotróf tagja (Yamada és mtsai, 2007). A termofil, szigorúan anaerob kemoorganotróf életmód jól illeszkedik a BTK által biztosított feltételekhez. A klónok a felsorolt rendek mellett a legnagyobb szekvenciaegyezést még a Caldilineales rend képviselőivel mutatták. Három mintavételi hely (Molnár János-barlang, Rudas-Török-

forrásbarlang, Rác-fürdő Nagy-forrás) esetében pedig a törzs képviselői fordultak elő legnagyobb arányban.

A déli rendszerben a Chloroflexi törzs relatív abundanciájának növekedése figyelhető meg a Gellért Ősforrástól a Rác-fürdő Nagy-forrásáig. Utóbbi forrásban a törzs képviselői 67%-ban voltak jelen. A déli rendszert figyelembe véve a Rác-fürdő Nagy-forrásának biofilmjében volt megfigyelhető a legalacsonyabb bakteriális diverzitás. A pásztázó elektronmikroszkópos megfigyelések alapján, illetve szabad szemmel láthatóan is ez a biofilm volt a legvékonyabb és legkevésbé strukturált. Ezzel szemben a Gellért Ősforrásból származó biofilm mintákban tapasztaltuk a legnagyobb bakteriális sokféleséget. A Gellért-hegy déli rendszerének forrásai, forrásbarlangjainak vizei főként a triász dolomitből fakadnak, míg a Rác-fürdő Nagy-forrása esetében a víz a Budai Márga hasadécai között bukkan fel. Feltehetően így, az egyes mintavételi helyeken a mért fizikai és kémiai paraméterek mellett, egyéb hidrogeológiai tényezők is fontos szerepet tölthetnek be a kialakult biofilm szerveződésében és bakteriális sokféleségének kialakításában.

A Chloroflexi törzs képviselői gyakran fordulnak elő különböző termálvizekben, illetve barlangi környezetekben is (Barton, 2015). Hipogén eredetű barlangokból, mint amilyen a Lower Kane-barlang (Wyoming), Frasassi-barlang (Olaszország) és a Villa Luz barlangrendszer (Mexikó), szintén azonosítottak már Chloroflexi törzshöz tartozó fajt (*Chloroflexus* spp.) (Engel, 2007). A Dunántúli-középhegység egyik természetes termálvíz megcsapolódási végpontjának tekinthető Hévízi-tó esetében az üledéket is döntő többségben a törzs (Anaerolineaceae család) tagjai alkották. A Harkányban (Villányi-hegység) található Büdöstapolca-II-es termelőkút vizéből Miseta (2012) szintén azonosította a törzs képviselőinek jelenlétét. Feltételezhető, hogy a törzs képviselői állandó tagjai lehetnek a magyar termálkarsztrendszereknek.

A Nitrospirae törzs tagjai a Városligeti kút kivételével minden mintában megtalálhatóak voltak. A déli rendszerhez tartozó, egymással szomszédos Diana-Hygieia- és Rudas-Török-forrásbarlangokban pedig domináns közösségalkotókként azonosítottuk őket. A klónok nagy szekvenciaegyeztést mutattak a termofil, nitrit-oxidáló termálforrásból leírt *Nitrospira calida*, illetve a fűtőcsövekből izolált *Nitrospira moscoviensis* baktériumfajokkal (Lebedeva és mtsai, 2011; Ehrich és mtsai, 1995). Az ausztráliai Nullarbor-síkság biofilmjei között szintén nagy arányban fordultak elő a törzshöz tartozó *Nitrospira* nemzetség képviselői. A klónok jelentős része ez esetben szintén az autotróf nitrit-oxidáló *Nitrospira moscoviensis* fajjal mutatta a legnagyobb szekvenciaegyeztést (Holmes és mtsai, 2001). Az

utóbbi időben egyre több tanulmány jelenik meg arra vonatkozóan, hogy a Nitrospirae törzs képviselői jelentős többlettel jelennek meg felszín alatti karsztos környezetekben (Saiz-Jimenez, 2015; Marks és mtsai, 2012; Holmes és mtsai, 2001; Pašić és mtsai, 2009; Kostanjšek és mtsai, 2013; Pleše és mtsai, 2016; Baskar és mtsai, 2016).

A Proteobacteria törzs tagjai, akárcsak a legtöbb barlangi környezet esetében is, meglehetősen nagy számban fordultak elő a klónjaink között mind a biofilm, mind pedig a vízminták esetében. A törzs képviselői a Gellért Ősforrásban (59%), illetve a Diana-Hygieia-forrásbarlangban voltak a legabundánsabbak a biofilm minták esetében. A törzsön belül az Alpha-, a Beta-, a Gamma-, illetve a Deltaproteobacteria osztályok tagjai egyaránt képviseltették magukat, kivételt képezett ez alól a Városligeti kút biofilmje, illetve a Rác-fürdő Nagy-forrása. Előbbiben a Proteobacteria törzs egyáltalán nem, míg utóbbiban az Alpha- és Gammaproteobacteria osztályok tagjai nem voltak kimutathatók. A Proteobacteria törzs számos barlang esetében a legnépesebb csoportot alkotja, legyen szó barlangi szpeleotémáról vagy vízmintáról (Porter és mtsai, 2009; Macalady és mtsai, 2006, Northup és mtsai, 2003; Holmes és mtsai, 2001; Pašić és mtsai, 2009).

A kemoorganotróf Alpha- és Gammaproteobacteria osztályok kevesebb, mint 6% relatív abundanciával voltak jelen a biofilm mintákban a Gellért Ősforrás biofilmje kivételével. A GOBB mintában az Alphaproteobacteria osztály relatív abundanciája 14% volt, nagy arányban jelentek meg a Rhodospirillales rend tagjai, melyek fontos szerepet tölthetnek be anaerob fermentációs folyamatokban.

A BTK forrásainak vizében mért magas szulfát tartalommal összhangban (mind a déli rendszer, mind az északi rendszerhez tartozó Molnár János-barlang esetében) nagy arányban jelentek meg a Deltaproteobacteria osztályhoz tartozó anaerob szulfát-, nitrát- és vas(III)-redukáló taxonok is (pl. *Deferribacter*, *Desulfobacter*, *Desulfuromonas*, *Deferriusoma*) a biofilm mintákban.

A vízmintákból létrehozott klóntárakban (MJWB, VLWB, DHWB, RTWB) kivétel nélkül a Betaproteobacteria osztály dominanciáját (78-99%) mutattuk ki. A vízmintákban előforduló klónok döntő többsége kemolitotróf kén-oxidáló anyagcserével jellemezhető baktériumfajokkal (*Annwoodia aquesulis*, *Thiobacillus thioparus*, *Sulfuritortus calidifontis*) mutatott nagy szekvenciahasonlóságot. A reprezentáns klónok nukleotidszekvenciáit BLAST programban egymáshoz elillesztve azt tapasztaltuk, hogy az egyes klónok szinte minden esetben 99%-os egyezést mutattak egymáshoz, kivétel az egyes reprezentáns klónok (RTWB-A4, MJWB-C7, VLWB-C7) DHWB-C2 jelzésű klónnal való elillesztése, mely esetekben

csak 92-93%-os egyezést tapasztaltam. A BTK-hoz tartozó források, illetve forrásbarlangok vizében a baktériumközösségek nagy részét, a Diana-Hygieia-forrásbarlang kivételével közel 100%-ban alkotó filotípusok esetében azonban nem volt lehetséges faji vagy nemzetség szintű identifikáció, hiszen 91-93%-os bázissorrendbeli egyezést tapasztaltunk minden esetben. Ezt a vízben domináns filotípust azonban a biofilm minták esetében nem tudtuk kimutatni. A Betaproteobacteria osztály tagjai jelentős szerepet tölthetnek be a kén oxidációjában, hiszen ezen osztály képviselőinek jelenléte vagy hiánya meghatározó lehet a szulfidos karsztos környezetekben. A barlangokban fontos szereppel bíró kén anyagcsere, illetve a SOB szerepe a kénsavas barlangképző folyamatokban jelentős, hiszen a SOB kénsavat képezhetnek, melyek oldhatják a karbonátokat. A BTK vizeiben azonban közel semleges pH értékeket mértünk minden esetben, mely betudható a karbonátos alapkőzet pufferoló kapacitásának.

A Betaproteobacteria osztály képviselői a Városligeti kút kivételével mindenhol megtalálhatók voltak a biofilm mintákban is. A GOBB mintában pedig meglehetősen nagy arányban fordultak elő az osztály tagjai. A klónok egy része (10%) a vízben megtalálható domináns filotípussal 95%-os egyezést mutatott, azonban faji vagy nemzetség szintű azonosításra az alacsony bázissorrendbeli egyezések miatt ez esetekben sem volt lehetőségünk. A Gellért-fürdő Ősforrásában nagy arányban fordultak elő a kén-oxidáló *Sulfurisoma* nemzetség tagjai is, melyek redukált kénvegyületeket (pl. elemi ként, tioszulfátot) használnak energiaforrásként (Kojima és Fukui, 2014). A GOBB minta mellett a DHBB mintában voltak jelen az osztály képviselői nagy számban. A Diana-Hygieia-forrás biofilmjének klónjai olyan tenyésztésbe nem vont baktériumklónokkal mutatták a legnagyobb szekvenciaegyezést, melyeket a Földközi-tenger egy iszapvulkánjából izoláltak (Pachiadaki és mtsai, 2010).

Az Aquificae törzs képviselői csak a Széchenyi termálfürdőt ellátó szulfidban gazdag városligeti karsztkút biofilmjében voltak megtalálhatók. A VLBB klóntárban a legnagyobb arányban megtalálható, csak erre a mintára jellemző Aquificae törzsbe tartozó klónok a legnagyobb szekvenciaegyezést a termofil hidrogén-oxidáló *Sulfurihydrogenibium azorense* baktériumfajjal (Aquificales rend) mutatták, melyet egy hőforrásból izoláltak az Azori-szigetéről (Aguiar és mtsai, 2004). A szigorúan termofil Aquificales rend tagjai zömmel hidrogén-oxidáló szervezetek, melyeket számos hidrotermális rendszer esetében írtak már le világszerte (Blank és mtsai, 2002; Eder és Huber, 2002; Hirayama és mtsai, 2005). A *Sulfurihydrogenobium* fajok meglehetősen gyakoriak közel semleges pH-n, illetve magas hőmérsékleten (Hirayama és mtsai, 2005).

A VLBB klónok között nagy arányban fordultak elő a *Deinococcus-Thermus* törzs képviselői is. A törzs tagjai között kizárólag a *Thermus scotoductus* faj képviselői voltak jelen. A mély bioszférában a prokarióták a teljes élő biomassa 10-33%-át teszik ki, ennek ellenére mégis nagyon kevés prokarióta szervezetet izoláltak és írtak le szárazföldi és óceáni felszín alatti környezetből. A kivételek egyike a termofil (55-75 °C hőmérsékleti optimum), fakultatív anaerob *Thermus scotoductus* faj, melyet egy 3200 m mély dél-afrikai aranybánya talajvizéből izoláltak (Takai, 2011). A VLBB minta esetében megfigyelhető meglehetősen alacsony genetikai diverzitás feltehetően a karsztvíz fizikai-kémiai paramétereiben (elsősorban a vízhőmérsékletben) megfigyelhető különbségekre vezethető vissza.

A karsztos barlangi környezetek Archaea sokfélesége, a Bacteria doménnel szemben, jelentőségük ellenére jórészt feltáratlan (Legatzki és mtsai, 2011; Tetu és mtsai, 2013; Ortiz és mtsai, 2014). A BTK barlangjaiban és forrásbarlangjaiban előforduló biofilmekből létrehozott klóntárakban az RNBA minta kivételével legnagyobb arányban a Thaumarchaeota törzs képviselői fordultak elő. Mindegyik biofilm mintában a törzshöz tartozó ammónia-oxidáló Archaea (AOA) szervezetek (pl. „*Candidatus Nitrososphaera gargensis*”, *Nitrososphaera viennensis*, „*Candidatus Nitrosoarchaeum limnia*”) nagy arányát mutattuk ki. Az AOA szervezetek jelentőségét magas hőmérsékletű környezetekben először Dodsworth és mtsai (2011) vizsgálták. Annak ellenére, hogy a geotermikus rendszerekben az ammónium ion jelen van és az aerob ammónia oxidáció folyamata termodinamikailag kedvező, termofil AOA szervezetek leírása először csak nemrégiben történt meg (De la Torre és mtsai, 2008). Az első AOA szervezetet, a „*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*-t”, Könneke és mtsai (2005) írták le. Az utóbbi időben számos AOA szervezetet izoláltak világszerte, melyek változatos hőmérsékleti tartományban, illetve különböző pH értékeknél fordultak elő, ami széleskörű előfordulásukat sejteti. A Kamcsatka-félszigeten található Uzon-kaldera kráterének gőzölgő krátertavai esetében 42-85 °C-os hőmérsékleti tartományban, illetve a savastól a neutrális pH-ig széles körben megtalálhatóak voltak az AOA szervezetek (Zhao és mtsai, 2011). A hipogén Frasassi-barlang biofilmjében az Archaea domén tagjai közül a termofil, acidofil *Ferroplasma* nemzetség volt jelentős. A Frasassi-barlangból a Crenarchaeota törzs tagjait (Macalady és mtsai, 2007), illetve a Movile-barlangból pedig ammónia-oxidáló archaea szervezet jelenlétét nem tudták kimutatni, utóbbiban a *Nitrosomonas* spp. a fő nitrifikáló szervezetek (Chen és mtsai, 2009). A BTK biofilmjeiben található AOA szervezetek dominanciája arra utal, hogy a nitrifikáció fontos szerepet tölthet be az elsődleges termelésben ezekben a forrásokban.

A Thaumarchaeota törzsbe tartozó klónok nagy száma mellett az RNBA minta esetében az Euryarchaeota törzs is jelentős arányban képviseltette magát, azonban ez utóbbi taxonnál zömmel tenyésztésbe nem vont klónokat sikerült kimutatnunk, melyek esetében a nemzetség szintű azonosítás sem volt lehetséges.

7.2. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok vizére és egyes kiválás típusaira jellemző baktériumközösségek diverzitása amplikontárak alapján

A BTK rózsadombi megcsapolódási rendszeréhez tartozó Molnár János-barlang Európa legnagyobb aktív hévizes barlangja, mely vizét a mélyből feltörő meleg, valamint a Budai-hegyek felől áramló hideg karsztvíz határozza meg. A keveredési korrózióknak a barlang járatainak kialakulásában nagy szerepe lehet. A Molnár János-barlang barna biofilmjét, üledékét, továbbá hideg, meleg és kevert vizét a 16S rRNS marker gén V3-V4 régiója alapján nagy áteresztőképességű új generációs szekvenálással vizsgáltuk meg. A hideg vízben jelentős arányban fordultak elő a nitrit-oxidáló (*Nitrospirae*) baktériumok képviselői. A *Nitrospirae* nemzetség az üledék, a meleg és a kevert vízmintákban is nagy arányban képviseltette magát. Az ausztráliai Nullarbor-barlangban, mely szintén víz alatti barlang, mint ahogy a Molnár János-barlang, szintén detektálták a nemzetség képviselőit (Holmes és mtsai, 2001). A meleg és kevert vízben az Epsilonproteobacteria osztályhoz tartozó anaerob kemolitotróf kén-oxidáló *Sulfuricurvum* és *Sulfurovum* nemzetségek képviselőit azonosítottuk nagy arányban a meghatározott NGS amplikonok között. Mind a *Sulfuricurvum*, mind a *Sulfurovum* fajok a kevert vízben nagyobb arányban képviseltették magukat, mint a meleg vízben. Az Epsilonproteobacteria osztály képviselői ritkán találhatók meg nem szulfidos karsztrendszerekben, az osztályhoz tartozó kén-oxidáló baktériumok, mint ahogy a *Sulfuricurvum* és *Sulfurovum* nemzetségek is, jelentős szerepet tölthetnek be a kénsavas barlangképző folyamatokban is. Érdekes, hogy ennek az osztálynak a képviselői szinte teljesen hiányoztak a többi minta esetében. A meleg és kevert vízre jellemző kén-oxidáló *Sulfuricurvum* és *Sulfurovum* nemzetségek a szintén hipogén eredetű olaszországi Frasassi-barlang biofilmjére is jellemzőek voltak. A Frasassi-barlang biofilmjéből is kimutatható kén-oxidáló fajok genomjainak vizsgálatai során kimutatták, hogy ezen szervezetek a kén oxidációjára a Sox-rendszert használják (Jones és mtsai, 2012; Hamilton és mtsai, 2015). Ezen genomok alapján megállapítást nyert, hogy a *Sulfurovum* fajok esetében a szulfid oxidációja nem lehetséges egészen a szulfátig, ellentétben a *Sulfuricurvum* fajokkal. A

Frasassi-barlang biofilmjében megtalálható *Sulfurovum* fajok jóval abundánsabbak voltak a *Sulfuricurvum* fajokkal szemben, míg a Molnár János-barlangban a *Sulfuricurvum* fajok jóval nagyobb arányban voltak megtalálhatóak, mint a *Sulfurovum* nemzetség képviselői. A hipogén eredetű wyomingi Lower Kane-barlang szulfidos vizében és biofilmjében szintén nagy arányban fordultak elő az Epsilonproteobacteria osztályhoz tartozó anaerob kemolitotróf *Sulfuricurvum* nemzetség tagjai. A Movile-barlang esetében ugyancsak beszámoltak fakultatív anaerob kén-oxidáló szervezetek jelenlétéről, melyek nitrátot használnak alternatív elektron akzeptorként. Ezen szervezetek hasonló arányban voltak jelen, mint az obligát aerob kén-oxidáló fajok (Rohwerder és mtsai, 2003). A Movile-barlang mikrobiális szövetéből ugyanúgy kimutatták az anaerob kén-oxidációra képes *Sulfuricurvum* nemzetséget (Chen és mtsai, 2009). Feltételezhetően e kén-oxidáló szervezetek világszerte előfordulhatnak hipogén barlangokban, ugyanakkor érdekes, hogy képviselőiket csak a Molnár János-barlangból és csak a kevert és meleg víz mintákból tudtuk kimutatni. A víz alatti barlangokban nagy arányban fordulnak elő a kemolitoautotróf aerob, illetve mikroaerofil kén-oxidáló, fonalas szerveződésű baktériumok (Banerjee és Joshi, 2013). A Molnár János-barlang kén-oxidáló baktériumainak niche-elkülönülésében feltehetőleg a szulfid mennyisége, az oxigén jelenléte, illetve a vízáramlás maga is fontos hatótényező lehet.

A Gellért-hegy megcsapolódási területéhez tartozó Diana-Hygieia-forrásbarlang szpeleotémáit (biofilm, üledék és kalcit minták) szintén piroszekvenálás módszerrel vizsgáltuk. Mindhárom mintában megjelentek (a biofilm mintában a legnagyobb arányban) az azonosítatlan Bacteria domén taxonok, ami a barlang különleges és egyedi jellegét sejteti, hiszen ezen taxon képviselőit nem lehetett azonosítani, mivel tenyésztett képviselő hiányában a tudomány számára ma még ismeretlenek. A Diana-Hygieia-forrásbarlanggal szomszédos Rudas-Török-forrásbarlang biofilm és kalcit mintáiban szintén előfordultak az azonosítatlan Bacteria taxonok, itt is, akárcsak a DHB minta esetében a biofilm mintában (RTB) jelentek meg nagy arányban ezen ismeretlen prokarióta szervezetek. Mind a Diana, mind a Rudas-Török mintákban (biofilm, kalcit és üledék) jelentős arányban fordultak elő a Nitrospirae törzs (*Nitrospira* nemzetség) tagjai is. A Diana-Hygieia-forrásrendszer esetében a kalcit mintában nagyobb volt a nemzetség relatív abundanciája, mely igaz a Rudas-Török-forrásbarlang kalcit mintája esetében is, jóllehet itt többszöröse volt a nemzetség relatív abundanciája az RTB mintához képest. A nitrit-oxidálók aktivitásuk révén a forrásbarlangok vizében mért alacsony nitrit (mindkét forrás esetében kevesebb, mint $0,01 \text{ mg l}^{-1}$) koncentráció értékek megjelenéséhez járulhatnak hozzá. A nagyon alacsony nitrát koncentráció értékek (Diana-

Hygieia forrás esetében $1,3 \text{ mg l}^{-1}$, míg Rudas-fürdő Török-forrás esetében kevesebb, mint 1 mg l^{-1}) háttérben az asszimilatórikus nitrát-redukció vagy denitrifikáció általi gyors turnover állhat (Kumaresan és mtsai, 2014). A kén-oxidáló baktériumok légzési anyagcseréjében ugyan az oxigén a leggyakoribb végső elektronakceptor, egyesek (pl. *Thiobacillus denitrificans*, *Sulfurimonas denitrificans*) nitrát jelenlétében anaerob légzésre is képesek. Az utóbbi években egyre több fakultatív anaerob, nitrát redukáló kén-oxidáló kemolitotróf baktériumfajt írtak le (Engel, 2007).

A Diana-Hygieia-forrásbarlang biofilmjében jelentősnek bizonyultak az Acidobacteria törzs tagjai is, melyeket gyakran mutatják ki talajokból, hőforrásokból és barlangokból (Meisinger és mtsai, 2007). Az Acidobacteria törzs jelenleg 26 alcsoportot tartalmaz. Szárazföldi környezetekben az 1, 3, 4 és 6-os alcsoportok a leggyakoribbak, míg barlangokból elsősorban az 1-11-es alcsoportokat (a 2-es alcsoport kivételével, mely csoport tagjai talajokban, illetve szárazföldi környezetekben fordulnak elő) azonosították ezidáig (Saiz-Jimenez, 2015). Ez azért is érdekes, mert a DHB mintában az Acidobacteria 2-es alcsoportja volt nagy arányban kimutatható. A dél-dakotai Wind Cave-barlangban az 5-ös alcsoport, míg a Lower Kane Cave-barlangban a 7-es és 8-as alcsoportok jelentek meg. Az Actinobacteria sejteket szinte minden esetben Gamma- és vagy Epsilonproteobacteria osztályokhoz tartozó fonalas baktériumokkal szimbiózisban találták meg ezen minták esetében (Saiz és Jimenez, 2015). Ez az együttélés is a biofilm közösségek meglehetősen összetett kapcsolatrendszerét erősíti.

A DHC mintában a Deltaproteobacteria osztályhoz tartozó Myxococcales rend képviselői is előkerültek. A rend tagjait korábban az Altamira-barlangból is leírták (Portillo és mtsai, 2008). A DHC mintában, hasonló relatív abundancia értékekkel, mint a Myxococcales rend, megjelentek a Firmicutes törzshöz tartozó *Bacillus* nemzetség képviselői is. A DHB és DHS mintákban a törzs egyáltalán nem fordult elő, akárcsak az RTB mintában. Az RTC minta esetében ugyan kimutatható volt a törzs, de csupán két szekvenciát azonosítottunk *Bacillus*-ként. Az ismerten nagy ellenállóképességű, endospórát képező *Bacillus* nemzetség tagjait kitenyésztettük korábban a Diana-Hygieia-forrásbarlangból is (Anda és mtsai, 2014; Enyedi, 2016; Enyedi és mtsai, 2019). A korábbi tenyésztésen alapuló közösség szerkezeti vizsgálatok alapján elmondható, hogy a *Bacillus* nemzetség bizonyult a legkönnyebben tenyésztethető nemzetségnek a forrásrendszerből. Mivel a BTK forrásai magas radon tartalmúak, a mikroorganizmusok felhetőleg különféleképpen alkalmazkodhatnak ezen extrém környezethez. A DHC mintában nagy arányban voltak megtalálhatók a nemzetség

tagjai. Ilyen, a Rudas-Török, illetve Diana-Hygieia-forrásbarlangokból is kitenyésztett *Bacillus cereus*, melynek sejtfalának S-rétege védi a gamma-sugárzástól a sejtet (Kotiranta és mtsai, 1999). Mind a Diana, mind a Rudas-Török-forrásbarlangból sikerült olyan *Bacillus* fajokat kitenyésztünk (*Bacillus arayabhattai*, *Bacillus subtilis* subs. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subs. *inaquosorum*), melyek a 15 kGy-es gamma-sugárdózis mellett is életképesek maradtak. Érdekes viszont, hogy a piroszekvenálással feltárt biofilm bakteriális közösségen belül (mind az RTB, mint a DHB minták esetében) a *Bacillus* nemzetség képviselői egyáltalán nem kerültek elő, míg tenyésztési módszerrel mindkét esetben mind a kezeletlen, mind a besugárzott mintákból a nemzetség számos képviselőjét vontuk tenyésztésbe. A DHB minta esetében a nemzetség 21, míg az RTB minta esetében a nemzetség 9 képviselőjét sikerült azonosítanunk (Pál, 2015, Enyedi, 2016; Enyedi és mtsai, 2019).

A Chloroflexi törzs képviselői, a törzshöz tartozó Anaerolineaceae családból a DHS, illetve az RTB mintákból kerültek elő. A Rudas-fürdő Török-forrásának biofilmjéből molekuláris klónozás módszerével is nagy arányban azonosítottuk a törzs tagjait. A DHB, DHC és RTC mintákban is megtalálhatóak voltak a család tagjai, de nem voltak gyakoriak. Feltételezhetően a Rudas-fürdő Török-forrásának biofilmjéről készült pásztázó elektronmikroszkópos felvételeken is jól látható hálózatos struktúrát is e csoport fonalas szerveződésű tagjai alkotják. A SEM felvételek alapján ugyan a Diana-Hygieia-forrásbarlang biofilmjét is jelentős mértékben alkotják fonalas baktériumok (különleges retikulált fonalak), de ezen szervezetek eltértek a Rudas-Török-forrásbarlang fonalas szervezeteitől (Pál, 2015, Enyedi, 2016).

A Parcubacteria törzs tagjai a DHC, DHS valamint RTB és RTC mintákban voltak meghatározók. A DHB mintában a törzs csak 1% relatív abundancia értékkel rendelkezett. A törzs tagjai az egyszerű cukrok szerves savakká történő fermentációját végezhetik, habár egyes szervezetek képesek az összetett szénforrások (pl. kitin, cellulóz) bontására is (Nelson és Stegen, 2015).

7.3. Termálvíz megcsapolódáshoz köthető biofilm képződési folyamatok kísérleti tanulmányozása

Egy modellrendszer összeállításával a BTK déli rendszeréhez tartozó Rudas-fürdő Török-forrásánál a megcsapolódáshoz köthető biofilm fejlődését és a fizikai-kémiai paraméterek változását vizsgáltuk. A forrásbarlangban a vizsgált időszakban a környezeti

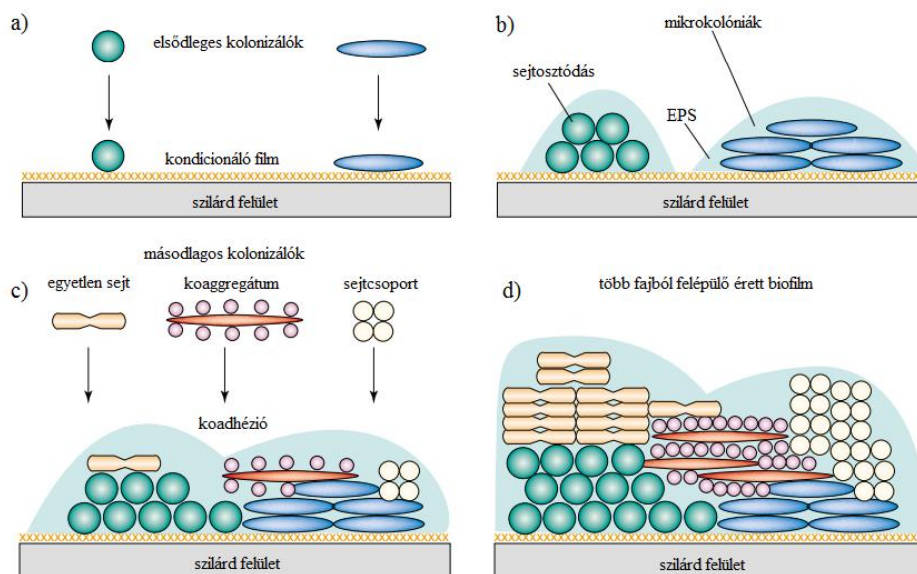
paraméterek (vízszint, hőmérséklet, fajlagos elektromos vezetőképesség, pH és oldott oxigén) nem mutattak jelentős változást. A környezeti paraméterek függvényében tehát elmondható, hogy egy meglehetősen stabil rendszerről van szó, ahol a biofilm fejlődése ellenőrzött körülmények között vizsgálható.

A mikroorganizmusok kitapadása a szilárd felületekhez (közethez, tárgylemezhez), illetve a biofilm fejlődése meglehetősen összetett folyamat, melyet számos tényező befolyásol (Simões és mtsai, 2010). A biofilmek képződését, fejlődését eddig leginkább laboratóriumi körülmények között vizsgálták, pl. a *Pseudomonas aeruginosa* (Davies és mtsai, 1998; Ma és mtsai, 2009; Yang és mtsai, 2011), továbbá a *Bacillus subtilis* (Vlamakis és mtsai, 2013) törzsek biofilm képző képességének kapcsán. A természetben előforduló, számos faj alkotta biofilmek azonban sokkal bonyolultabbak, mint az említett laboratóriumban vizsgált társaik. A biofilmek és a vizek fizikai-kémiai paramétereinek egy helyen, hosszabb ideig tartó kísérleti körülmények közötti vizsgálata újdonságnak számít.

A planktonikus előfordulással szemben a biofilmekbe való ágyazódás számos kedvező lehetőséggel bír. Ez olyan előnyöket jelent a mikroorganizmusok számára, mint a horizontális génátvitel, de a biofilm rezisztensebb az UV-sugárzással szemben, illetve a pH és az oxigén változásaira is kevésbé érzékenyek a biofilmben élő szervezetek (Madsen és mtsai, 2012). A változó és extrém környezeti feltételekhez való sikeres adaptáció attól függ, hogy a biofilm tagjai képesek-e érzékelni a környezeti változásokat és ennek megfelelően tudják-e a génexpressziójukat szabályozni, így reagálva a külső környezet változásaira. A siker kulcsát a mikroorganizmusok által termelt anyagcseretermékek képezik, melynek hatására expresszálnódhat egy bizonyos gén vagy éppen leállhat a működése. Ez a Quorum Sensing (QS) folyamata, mely az autoindukció folyamatán alapul (Daniels és mtsai, 2004). A QS rendszer által használt kémiai jelek meglehetősen változatosak lehetnek. A Gram-negatív baktériumok esetében ezek a jelek általában kis molekulák, míg a Gram-pozitív baktériumok módosított oligopeptidek segítségével kommunikálnak. A jelek visszacsatolását a Gram-negatív baktériumoknál a sejtmembránon történő diffúzió biztosítja, amely könnyen átjárható a kisebb molekulák számára. A nagyobb peptid molekuláknál külön fehérjék végzik a visszacsatolás folyamatát. A szabályozás folyamata az egyes baktériumok esetében nagyon eltérő lehet (Waters és Bassler, 2005).

A biofilmképződés kezdeti szakaszában az elsődleges kolonizáló szervezetek specifikus és nem-specifikus kölcsönhatások révén kapcsolódnak a szilárd felületekhez kitapadt kondicionáló filmhez, amely különböző szerves anyagokból áll (48. ábra). A

sejtfelület tulajdonságai, különösen az extracelluláris sejtalkotók, mint a csillók, fimbriák, pilusok nagyon fontosak lehetnek a kitapadás folyamatában. Számos Gram-negatív baktérium, beleértve egyes *Pseudomonas* fajokat is, rendelkezik fimbriával illetve pilusokkal, melyekkel baktériumokhoz, illetve felületekhez tapadhatnak ki. Megfelelő körülmények esetén a már rögzült sejtek növekedni kezdenek, osztódnak és az azonos fajokhoz tartozó sejtsoportokból mikrokolóniák jönnek létre (48. b ábra). A három hetes biofilm minta pásztázó elektronmikroszkópos felvételein csak pár, eltérő méretű, sejtsoportot nem képező, zömében fonalas baktériumot figyeltünk meg. Ezen baktériumok kitapadását feltehetőleg sejtfelületük tulajdonságai, extracelluláris sejtalkotói segíthették. A mikrobiális sejtek extracelluláris polimer mátrixba (EPS) ágyazódva fordulnak elő a biofilmben (48. b ábra), ez az EPS poliszacharidokból, glikoproteinekből, exoenzimekből és nukleinsavakból áll, mely közvetlenül kapcsolódik egy hordozó felülethez, más néven szubsztráthoz (Decho, 1990; Wingender és mtsai, 1999). Az EPS hidrogén kötésekkel nagy mennyiségű vizet tud megkötni, így hidratáltsága védi a sejteket a kiszáradással szemben (Donlan, 2002). Az EPS a Rudas-Török-forrásbarlangban végzett megcsapolódáshoz köthető biofilm fejlődésének vizsgálatát célzó kísérletünk alatt a 9-12. hetektől volt először megfigyelhető. Ez az EPS nagyon fontos szerepet tölt be a biofilm képződésének mind a korai, mind a késői szakaszában. Az aggregációban és magában a biofilm struktúrájában betöltött szerepén kívül védelmi funkciót is ellát. Számos bizonyíték utal arra is, hogy antibiotikumokkal szembeni toleranciához is hozzájárulhat az extracelluláris polimer mátrix (Jefferson, 2004). A biofilm mátrix stabilizálásában a kalcium, vas, illetve mangán ionok felhalmozódásának lehet szerepe karboxilcsoportok, illetve hidroxilcsoportok jelenléte révén (Flemming és mtsai, 2016). A BTK biofilm minták nagy vas-oxid tartalmát elemanalízis vizsgálatok és Mössbauer spektroszkópiás vizsgálatok is bizonyították (Kuzmann és mtsai, 2014).



48. ábra. A biofilm kialakulásának szakaszai a) A biofilm képződés kezdeti szakasza az elsődleges kolonizáló sejtekkel b) A sejt növekedés, osztódás és EPS termelés mikrokolóniák kialakulásához vezet c) A másodlagos kolonizáló sejtek az elsődleges kolonizálók sejtjeihez kapcsolódnak d) A több fajból felépülő érett biofilm (Rickard és mtsai, 2003 alapján)

A fiatal biofilmben megváltoznak a környezeti feltételek az elsődleges kolonizáló sejtek szaporodása miatt, melyek lefedik a szubsztrátot. Az elsődleges kolonizálókhoz később másodlagos kolonizáló szervezetek kapcsolódnak (48. c ábra). Ezen másodlagos kolonizáló sejtek állhatnak egyetlen sejtből, de lehetnek különböző fajok sejtjeiből álló koagregátumok vagy sejtcsoportok. A másodlagos kolonizáló sejtek további osztódásával és további EPS termeléssel egy több fajból álló érett biofilm szerveződik (48. d ábra) (Rickard és mtsai, 2003).

A biofilm fejlődése összefüggésbe hozható a fajszámbecslő és diverzitás indexek alakulásával is a Rudas-Török-forrásbarlangban, miszerint a bakteriális OTU-k száma a 9. hétig nőtt. A fajszámbecslő indexek között a legélesebb különbség a vízminta, a harmadik és hatodik hetek között volt megfigyelhető. Az OTU szinten megfigyelhető dinamikus változások zöme lezajlott a 12. hétig, így érett biofilmről a 9-12. hetektől kezdve beszélhetünk.

Érdekes, hogy a vízmintában szinte kizárólag egyetlen OTU (OTU 4 – azonosítatlan Betaproteobacteria) volt megtalálható, mely egy kén-oxidáló fajjal (*Sulfuritortus calidifontis*) mutatta a legnagyobb (93%) szekvenciaegyezést. Jóllehet, a szekvenciákat 97%-os bázissorrend egyezés felett rendelhetjük operatív taxonómiai egységekhez, ami a bakteriális taxonómiában használatos fajhatárt jelöli, illetve 95%-os bázissorrend egyezés esetén

rendelhetjük nemzetségekhez (Tindall és mtsai, 2010). Ebből adódóan a vízmintában szinte kizárólagosan előforduló OTU 4-ről nem sok információ áll rendelkezésünkre. Az OTU 4 funkciójának feltárása céljából shotgun metagenom szekvenálást tervezünk a jövőben, mely segítségünkre lehet abban, hogy jobban megértsük ennek a domináns nemzetségnek az ökológiai szerepét a Rudas-fürdő Török-forrásában. A Gellért-hegyi Rudas-Török-forrásbarlang vizének domináns szervezete azonban a biofilm mintákból szinte teljesen hiányzott, ami azért is nagyon érdekes, mert a mélyből a felszínre törő vízből alakul a biofilm közössége a barlangban.

A Proteobacteria törzs a biofilm mintákban nagy arányban fordult elő, ami nem meglepő, hiszen számos barlangi minta esetében képezi ez a törzs a közösség nagy részét (Barton, 2015). A biofilm mintáinkban a Gammaproteobacteria osztály kiemelendő, azonban azonosítatlan tagjairól szintén nem tudunk sokat. A biofilm mintákban szintén nagy arányban fordultak elő az azonosítatlan Bacteria taxonok, melyek relatív abundanciája jelentős mértékű növekedést mutatott a vizsgált év alatt. A WCHB1-60 törzs az első hat hét alatt teljesen hiányzott a közösségből. A törzshöz tartozó OTU 7 a 9. héttől jelent meg a közösségben és ezt követően egyre dominánsabbá is vált. A törzs gyakori előfordulásáról barlangokban azonban nem találtam szakirodalmi adatot, ezért is érdekes megjelenése a biofilm mintákban. A törzsbe tartozó szekvenciákat először a Wurtsmith víztározóból izolálták (Dojka és mtsai, 1998). Ezen taxonok tenyésztésbe vonása a jövőben fontos információval szolgálhatna funkciójuk megértése céljából. Lehetséges, hogy ezen ismeretlen taxonok nem csak a hazai barlangokban fordulnak elő, hanem világviszonylatban is kiemelkedő jelentőséggel bírhatnak.

A biofilm mintákban nagy arányban fordultak elő a Parcubacteria törzs képviselői is. Ezen szervezeteket eddig többnyire anoxikus környezetekben figyelték meg (Nelson és Stegen, 2015), amely összefüggésbe hozható a Rudas-Török-forrásbarlangban mérhető alacsony oldott oxigén értékekkel is. A Parcubacteria törzs tagjai kis genommérettel rendelkeznek (<1,1 Mbp), ami alapján feltételezhető, hogy szimbiotikus kapcsolatokat alakíthatnak a biofilmben (Hedlund és mtsai, 2014).

A Planctomycetes törzs tagjai (azonosítatlan Brocadiaceae) szintén dominánsnak bizonyultak a biofilmekben. A törzshöz tartozó „Candidatus Brocadiales” rend képviselői az anaerob ammónia oxidáció (anammox) folyamatában vehetnek részt, mely során a nitrit elemi nitrogénné redukálódik anaerob körülmények között (Kuypers és mtsai, 2003). Ezen a Planctomycetes törzsbe tartozó szervezetekre jellemző, hogy nem rendelkeznek peptidoglikán sejtfallal, így számos antibiotikummal szemben rezisztensek lehetnek, illetve a ragadozó fajok

által termelt hidrolitikus enzimekkel szemben is ellenállóak, mely kompetitív előnyt biztosít számukra. Az anaerob ammónia-oxidáló baktériumok nagyon lassan növekednek, a leggyorsabban növekvő fajok is 10 napos generációs idővel rendelkeznek (Fuerst és Sagulenko, 2011), ami összefüggésbe hozható azzal is, hogy a törzs relatív abundanciája jelentősen csak a hatodik héttől mutatott növekedést. A meglehetősen alacsony szerves anyag tartalmú közeghez így ezen szervezetek a lassú növekedésük miatt is jól alkalmazkodtak.

A Nitrospirae törzs tagjai, a törzshöz tartozó *Nitrospira* nemzetséggel nagy arányban jelentek meg a biofilmben a vizsgált időszak elejétől a végéig, jóllehet a 6. héten mutatták a legnagyobb relatív abundancia értékeket. A *Nitrospira* nemzetségre jellemző sejtalakot már a három hetes biofilm minta pásztázó elektronmikroszkópos képein is megfigyeltük. Molekuláris klónozás módszerével a déli rendszerhez tartozó egymással szomszédos Diana-Hygieia-, illetve Rudas-Török-forrásbarlangokban szintén domináns közösségalkotók voltak. A nitrogén a barlangokban ugyan korlátozott mennyiségben jelen levő tápanyag, ennek ellenére az utóbbi időben a nitrogén ciklus jelentőségét számos esetben megfigyelték (Marks és mtsai, 2012; Holmes és mtsai, 2001). A nitrit oxidációja nitráttá a barlangokban gyakran megfigyelt *Nitrospira* spp. és *Nitrobacter* spp. fajok közreműködésével valósulhat meg (Ortiz és mtsai, 2015). A *Nitrospira* és *Nitrosospira* nemzetségek tagjait a kínai Jinjia mészkő barlang falán található lerakódásokból is nagy arányban mutatták ki (Wu és mtsai, 2015). A Hévízi-tó kevert vizeinek, biofilm és üledék minták piroszekvenálás módszerrel történt vizsgálatával a Nitrospirae törzs képviselői vagy egyáltalán (fehér biofilm) nem, vagy csak nagyon alacsony abundancia értékekkel jelentek meg (Krett, 2017; Krett és mtsai, 2017). Érdekes, hogy a harkányi langyos és termál karsztvízbázisokra telepített kutak mikrobaközösségében sem mutatták ki a törzs képviselőit (Miseta, 2012).

Az Archaea domén tagjait illetően a vizsgált időszakban egy növekvő trendet figyeltünk meg a 15. héttől, jóllehet Bacteria specifikus primerpárral dolgoztunk az amplifikáció során. Az ausztráliai Nullarbor karszt Webubbie- és az amerikai Kartchner-barlangok szpeleotémáinak vizsgálata során a szerzők kimutatták az Archaea domén tagjainak, különösen az ammónia-oxidáló ősbaktériumok (Thaumarchaeota törzs) fontosságát. A BTK barlangjaiban és forrásbarlangjaiban előforduló biofilmekből létrehozott Archaea klóntárakban szintén nagy arányban jelentek meg a törzshöz tartozó AOA-k. Ez tovább erősíti azt a feltételezést, miszerint a nitrifikációban a Rudas-fürdő Török-forrásban az AOA szervezeteknek is fontos szerepe lehet. Az Archaea domén jelentőségének feltárása a Rudas-

fürdő Török-forrásának biofilm képződésében a jövőben fontos feladat lehet a rendszer alapos megértése szempontjából.

A Chloroflexi törzs a biofilm mintákban végig dominánsnak bizonyult a törzshöz tartozó azonosítatlan *Anaerolineaceae* család képviselőivel. A Gram-negatív, fonalas szerveződésű, termofil, szigorúan anaerob anyagcserét folytató, kemoorganotróf szervezetek (Yamada és mtsai, 2006) a vázát adhatják a Rudas-Török-forrásbarlangban megfigyelhető biofilmeknek. A törzshöz tartozó fermentatív növekedésre képes Dehalococcoidia osztály képviselői széles körben találhatók meg barlangokban (Barton, 2015). A Dunántúli-középhegység természetes termálvíz megcsapolódási végpontjának tekinthető Hévízi-tó pirosekvenálással feltárt planktonikus baktériumközösségeiben a *Roseiflexus* nemzetség, valamint a barlangokban széles körben megtalálható Dehalococcoidales rend tagjai fordultak elő. A Chloroflexi törzs (*Anaerolineaceae*) nagy arányban azonban csak a tó üledék mintájában volt megtalálható. Tenyésztéstől független molekuláris módszerekkel a Chloroflexi törzs tagjainak, illetve más heterotróf baktériumoknak (pl. Chlorobi, Proteobacteria és Bacteroidetes törzs egyes tagjai) az együttélését korábban már kimutatták a fentiekben már említett anammox szervezetekkel. A Chloroflexi törzs tenyésztésbe nem vont tagjai anoxikus körülmények között képesek az N-acetil-glükózamin felhasználására (elektron akceptorként nitrátot hasznosítanak), melyet korábban fonalas Chloroflexi szervezeteknél is megfigyeltek aerob körülmények mellett is biofilmben. A legtöbb baktérium sejtfalának murein rétegének alapvázát alkotó N-acetil-glükózamin a sejtek pusztulásakor folyamatosan szabadul fel abban az esetben, ha anammox szervezetek vannak jelen a biofilmben, így a Chloroflexi törzs tagjai az anammox szervezetektől származó szerves anyagokat használhatják (Kindaichi és mtsai, 2012).

A biofilm közösség tagjai a sejtfaluk, továbbá az EPS kapcsán számos kötőhellyel rendelkeznek, melyek segítségével különféle anyagokat csapdázhathatnak és ezek fel is halmozódhatnak, így ezen szorpciós kapacitás teszi lehetővé, hogy a biofilm oligotróf közegben is növekedni tudjon (Flemming és mtsai, 2016). A szorpciós kapacitás természetesen nem csak a biofilm számára előnyös tápanyagok feldúsulására terjed ki, hanem különféle toxikus ágensek felhalmozására is. A biofilm szerveződése a rendelkezésre álló oxigén mennyiségének, illetve a tápanyag elérhetőségének függvényében tovább alakul. Az oxigén elérhetősége miatt a biofilm felsőbb rétegeiben aerob, majd fermentáló és anaerob szervezetek jelenhetnek meg, míg a tápanyag tekintetében a felsőbb rétegekben metabolikusan aktív sejtek, az alsóbb rétegekben pedig metabolikusan kevésbé aktív, lassan

növekvő szervezetek, illetve nyugvó állapotban levő sejtek találhatóak. A metabolikusan aktív sejteknél bizonyos esetekben fontos a sejtek szoros közelsége, melyre jó példa az ammónia-oxidáló, illetve nitrit-oxidáló baktériumok interakciója, hiszen az ammónia-oxidáló baktériumok nitritet állítanak elő, amit aztán a nitrit-oxidáló baktériumok tovább oxidálnak, így az interakció tekintetében a sejtek közelsége, feltételezhetően az általunk azonosított taxonok tekintetében is, elengedhetetlen (Flemming és mtsai, 2016; Tolker-Nielsen és Molin, 2000). A biofilmek jól működő szervezek, szerveződésük rendkívül bonyolult, melyek megértéséhez úgy vélem, fontosak lehetnek azon *in situ* modellrendszerek, melyek segítségével szerveződésük alaposan vizsgálhatóak lennének.

7.4. A BTK baktériumközösségeinek összehasonlító elemzése és lehetséges szerepe a karsztosodási folyamatokban

A Dunántúli-középhegység karbonátos víztározó rendszeréhez tartozó Budai Termálkarszt baktériumközösségeinek vizsgálata során megállapítottuk, hogy mind az északi, mind a déli rendszer esetében a víz és a biofilm minták külön csoportosultak a klónkönyvtárak vizsgálata során. A víz minták minden esetben jobban hasonlítottak egymáshoz, mint a biofilm minták. Mintáinkat új generációs szekvenálással elemezve azt láttuk, hogy a mintavételi helyek (Rudas-Török- és Diana-Hygieia-forrásbarlangok, Molnár János-barlang) meghatározóbbak voltak a baktériumközösségek összetételében, mint az egyes mintatípusok. A molekuláris klónozással és az új generációs szekvenálással elemzett minták közti eltérések mögött a két módszer felbontásbeli különbségén túl, az eltérő mintavételi időpontok is állhatnak. A biofilm, kalcit és üledék minták közösségösszetételükben nem igazán mutattak hasonlóságot. A Rudas-fürdő Török-forrás mintái, illetve a forrás szomszédságában található Diana-Hygieia-forrás mintái is jól elkülönültek egymástól annak ellenére, hogy mindkét mintavételi hely a BTK déli megcsapolódási rendszerhez tartozik és a két forrás meglehetősen közel is helyezkedik el egymáshoz.

A BTK vizeinek megcsapolódása a Budai-hegység és a Pesti-síkság találkozásánál történik (Eröss, 2010). Ezért sem meglepő, hogy a különböző rendű áramlási pályák megcsapolódási területén, a kiáramlási helyek környezetében képződött barlangokban található víz és kiválás típusok bakteriális közösség összetételében jelentős különbségeket fedeztünk fel, annak ellenére, hogy ezen üregek egy rendszerhez tartoznak-e vagy sem. Minden mintavételi hely, barlang, forrásbarlang egy sajátos mikrokörnyezetnek tekinthető.

A biofilm minták pásztázó elektronmikroszkópos felvételein is jól látható különbségeket fedeztünk fel az egyes rendszerek esetében, jóllehet minden esetben megfigyeltük azt is, hogy különböző ásványi anyagok halmozódtak fel a biofilmet alkotó baktériumok által kiválasztott EPS-ben. Számos olyan felvételt is készítettünk, melyeken olyan fonalas morfológiájú sejtek voltak megfigyelhetők, melyek ásványi anyagokat halmoztak fel a felszínükön, továbbá olyan apró üreges struktúrákat is azonosítottunk, melyek vélhetően ásványi anyagokat felhalmozó sejtek maradványai lehetnek. A mikrobiális metabolikus aktivitáshoz kapcsolható geológiai képződmények megjelenését (biomineralizációs folyamatok) számos barlang esetében bizonyították már (Hamilton, 2003; Baskar és mtsai, 2009; Banerjee és Joshi, 2013; Dhami és mtsai, 2018). A barlangi kiválastípusok, szpeleotémák kialakulása a barlangokban az elsődleges (primer) ásványokból különböző fiziko-kémiai reakciókhoz kapcsoltn történik. A redukált vegyületek mikrobiális úton történő átalakulása (oxidációja) a barlangokban aztán a másodlagos (szekunder) ásványi lerakódások megjelenéséhez vezethet, melyek a biofilmekben is megfigyelhetők. A mikroorganizmusok által termelt EPS fontos szereppel bír a karbonátos ásványi anyagok nukleációs helyeinek biztosításában is (Banerjee és Joshi, 2013). Az, hogy a barlangi szpeleotémák kialakulása biogén vagy abiogén folyamat, vagy e kettő kombinációja, ma még vita tárgyát képezi. Sok esetben nagyon nehéz, hacsak nem lehetetlen meghatározni, hogy a mikrobák aktív szerepet játszanak-e a különböző barlangi szpeleotémák kialakításában.

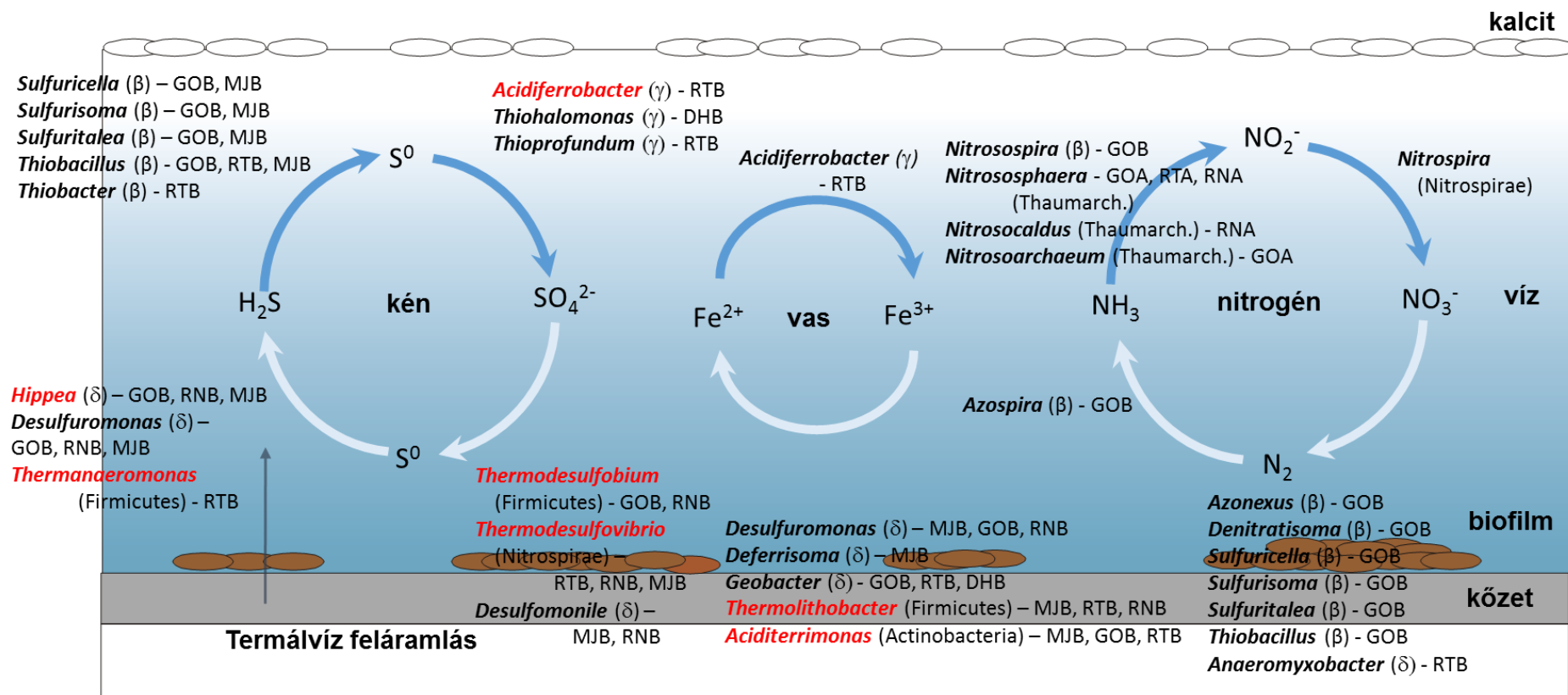
Néhány tanulmány már kimutatta, hogy barlangi környezetekből izolált baktériumok *in vitro* képesek szerves kalcium sókból különböző ásványok képzésére. A karbonátok kialakulásában az alábbi nemzetségek részvételét írták le: *Sporosarcina*, *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Myxococcus*, *Paenibacillus*, *Geobacillus*, *Syneccococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* (Dhami és mtsai, 2018). Ezen barlangi környezetekben a karbonát kicsapódással járó folyamatokat, melyek meglehetősen gyakoriak a baktériumok között, elsősorban heterotróf közösségek végzik (Lavoie és mtsai, 2010). Mintáinkban a karbonát kiválásában fontos szerepet betöltő nemzetségek közül a Myxococcales rend és a *Bacillus* nemzetség tagjait mutattuk ki. A két taxon képviselői szinte kizárólag a Diana-Hygieia-forrásbarlang kalcit mintájából kerültek elő. Azt azonban, hogy ezen taxonok tagjai aktívan részt vesznek-e a karbonátok precipitációjában a BTK barlangjaiban, csak további vizsgálatokkal tudnánk igazolni.

A karbonátok kiválása mellett fontos karsztosodási folyamat az oldódás is, hiszen a különböző kén-oxidáló baktériumok metabolizmusuk melléktermékeként keletkező kénsav

többek között a fent már említett formációk oldásához is hozzájárulhat. A ma is aktív barlangrendszerek esetében a kénsavas barlangképződés folyamatait csak egy-két barlangban bizonyították. Ezen karsztosodási folyamatok detektálása, illetve bizonyítása azon ténynek, hogy a mikroorganizmusoknak jelentős szerepe lehet az oldódási folyamatokban, meglehetősen nehéz. A SAS folyamatát sok esetben még mindig abiotikus folyamatoknak tekintik a számos barlangból leírt érvek ellenére (Paterson és Engel, 2015). Számos barlang esetében beszámoltak a csepegő vizek vagy biofilmek környezetében mért, rendkívül alacsony pH-ról (0-3) is. Azon barlangrendszerekben, ahol a SAS folyamatait leírták, azonosítottak olyan acidofil szervezeteket (pl. *Acidithiobacillus*), melyek a közösségekben nagy arányban fordultak elő. A szélsőségesen alacsony környezeti pH értékekhez való adaptáció e folyamatok során elengedhetetlen. E környezetekben az alacsony pH-t a mikrobiális kén-oxidáció mellett az tartja fenn, hogy a kénsav és a karbonátos kőzet reakciótermékeként gipsz képződik, mely „elválasztja” a barlangi karsztvizet a karbonáttól, így a karbonát pufferoló kapacitása nem valósul meg (Engel, 2012).

A BTK biofilmjeiben azonban acidofil szervezeteket nem detektáltunk, jóllehet számos esetben nem volt lehetőségünk faji vagy nemzetségi szintű azonosításra. Fakultatív kemolitoautotróf kén-oxidáló szervezetekkel rokon szekvenciákat viszont nagy arányban azonosítottunk a BTK karsztforrásainak vízmintáiból (49. ábra). A Rudas-Török-forrásbarlang vízmintáját szinte kizárólag olyan OTU előfordulása jellemezte, mely kén-oxidáló szervezetekkel mutatott nagy szekvenciaegyezést. Azonban azt, hogy ez a domináns OTU is valóban kén-oxidáló szervezet, csak akkor tudnánk biztosan, ha azonosítanánk a kén-oxidációval kapcsolatos géneket (például Sox-rendszer, szulfid-oxidáz) a genomban. Ehhez szintén még további vizsgálatok szükségesek. A BTK ásványkiválásainak vizsgálata során, a Rudas-Török-forrásbarlangban a vízfelszín felett azonosítottak vékony gipsz-kéreg bevonatot, mely a vízből kilépő H_2S falra való kicsapódásának és oxidálódásának következménye (Eröss, 2010). Azonban ez nem befolyásolja azt a tényt, miszerint a BTK vizeiben közel semleges pH értékeket mértünk, melynek hátterében a karbonát alapkőzet pufferoló kapacitása állhat. A Movile-barlang vizében mért közel semleges pH értékek okaként szintén a pufferoló hatást jelölték meg (Kumaresan és mtsai, 2014). A Movile-barlang esetében azonban számos acidofil szervezetet mutattak ki, ami azért is érdekes, mert a vízben mért pH semleges. Feltehetőleg a SOB által termelt kénsav oldó hatást mikrokörnyezetekben fejthet ki. Ennek alapján nem zárható ki, hogy mikrokörnyezetekben a biotikus SAS folyamatok a BTK-ban is

jelen vannak, ha nem is jelentősek, azonban ennek igazolására még szintén további vizsgálatok szükségesek.



49. ábra. A Budai Termálkarsztból kimutatott prokarióta szervezetek lehetséges szerepe a kén, vas és nitrogén vegyületek átalakításában (A nemzetségek neve - pirossal a termofil szervezetek - mögött zárójelben azoknak a mintavételi helyeknek a rövidítését tüntettük fel, ahonnan a nemzetségek képviselőit kimutattuk.)

8. Tézisek

A kutatásaink során feltárt új eredmények a következők:

1. A biofilm mintákról készült nagy felbontású pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján megállapítottuk, hogy a biofilmeket képező baktériumok mintavételi helytől függetlenül nagyon változatos morfológiával rendelkeztek. A kalcium-karbonát ásványok egyrészt kolonizációs felületként szolgáltak a baktériumok számára, másrészt a különböző ásványi anyagok a biofilmet alkotó baktériumok által kiválasztott EPS-ben is felhalmozódtak.
2. A BTK területéről származó biofilm mintákban, a vízmintákkal ellentétben, jóval nagyobb taxonómiai diverzitást tártunk fel molekuláris klónozással és új generációs szekvenálással egyaránt. A vizsgált mintákban a Proteobacteria, az Acidobacteria, az Aquificae, a Chlorobi, a Chloroflexi, a Firmicutes, a Nitrospirae, a Planctomycetes és a Parcubacteria törzsek domináltak. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok biofilmjéből létrehozott Archaea klóntárakban legnagyobb arányban a Thaumarchaeota törzs ammónia-oxidáló képviselői fordultak elő. Az alacsony szekvenciaegyeztések miatt számos esetben faji vagy nemzetség szintű identifikációra nem volt lehetőségünk.
3. A Rudas-fürdő Török-forrásánál kiépített, *in situ* modellrendszerben ellenőrzött, természetes körülmények között vizsgáltuk a megcsapolódáshoz köthető biofilm fejlődését. A fizikai-kémiai paraméterek alapján stabil rendszerben a biofilm minták taxonómiai diverzitása már a 3. héten elérte a maximumát, a vizsgált egy év során OTU szinten azonban dinamikus változások voltak felfedezhetők. Az érett biofilm kialakulásához 9-12 hétre volt szükség. A biofilm fejlődését összefüggésbe lehetett hozni a fajszámbecslő és diverzitás indexek alakulásával is. A legélesebb különbség a vízminta, valamint a harmadik és hatodik heti biofilm minták között volt megfigyelhető. A vízmintában szinte kizárólag egyetlen azonosítatlan Betaproteobacteria OTU fordult elő, mely a biofilm mintákból hiányzott.
4. A BTK barlangi és forrásbarlangi baktériumközösségeinek molekuláris klónozással történt elemzése során megállapítottuk, hogy az északi és déli rendszerhez tartozó víz és biofilm minták a városligeti minta kivételével együtt csoportosultak. Piroszekvenálással ugyanakkor az északi és a déli rendszerből származó minták szétválását figyeltük meg, beleértve a déli rendszerhez tartozó mintavételi helyek elkülönülését is.

9. Összefoglalás

A karsztjelenségek (barlangok, források, ásványkiválások) a felszín alatti víz közvetlen megnyilvánulásai. Az epigén karsztrendszerek esetében a csapadékvízből és a talajból származó szén-dioxid oldó hatása a legfontosabb karsztosodási folyamat, a hipogén karsztok kialakításában azonban számos más folyamat is szerepet játszhat. A Budai Termálkarszt (BTK) rendszerben, mely egy fedett és fedetlen karsztterület érintkezésénél, különböző eredetű és hőmérsékletű vizek megcsapolódási határfelületén húzódik, jelenleg is aktív hipogén karsztosodási folyamatok zajlanak. Ezek a termálkarsztos környezetek változatos élőhelyeket kínálnak a lebegő vagy felülethez rögzült életmódot folytató mikroorganizmusoknak. A Budai Termálkarszt területén, 2012 és 2016 között végeztünk mintavételezést, melynek során víz-, biofilm- és üledékmintákat gyűjtöttünk. Kutatásunk célja a BTK területén található barlangi és forrásbarlangi biofilmek morfológiai tulajdonságainak megismerése, a megcsapolódó víz és a speleotémák közösség szerkezetének feltárása volt, illetve egy terepi kísérleti modellrendszer kiépítése, melynek segítségével nyomon követtük a hipogén karsztosodási folyamatokban résztvevő baktériumközösségek összetételének változását. A BTK különböző barlangjaiból és forrásbarlangjaiból származó biofilm mintákat pásztázó elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk, míg a mikrobaközösségek diverzitásának meghatározását molekuláris klónozással és új generációs szekvenálással végeztük.

A biofilmekben a vízmintákhoz képest minden vizsgálati területen nagyfokú morfológiai és taxonómiai változatosság volt jellemző. Ezt a természetes körülmények között végbemenő biofilmképződést elemző, *in situ* modellrendszer segítségével végzett vizsgálatok eredményei is alátámasztották. Bár a biofilmeket alkotó taxonok jelentős részét az alacsony szekvenciahasonlóság ellenére nem tudtuk egyértelműen azonosítani, az OTU-kal legközelebbi rokonságban lévő fajok ismert anyagcsere tulajdonságai alapján megállapítható, hogy a BTK egyes kiválástípusaiban és vizeiben előforduló termofil, anaerob szulfát-, nitrát-, vas(III)-redukáló kemoorganotróf, valamint a kén-, ammónia-, és nitrit-oxidáló kemolitotróf szervezetek meglehetősen összetett anyagcsere hálózatokat alkothatnak. Mindez szoros összefüggésbe hozható a BTK által nyújtott sajátos környezettel, hiszen elsősorban a mezo/termofil, kemotróf anyagcserét folytató prokarióta szervezetek képesek alkalmazkodni az ezekre a barlangokra jellemző afotikus, alacsony szervesanyag tartalmú és geotermálisan fűtött környezeti feltételekhez. Ebből következően a szubterresztrikus baktériumközösségek feltárása a BTK geomikrobiológiai folyamatainak megértése szempontjából is kiemelkedően fontos.

10. Summary

The karstic phenomena (e.g. caves, springs, mineral precipitations) can be considered as direct manifestations of groundwater. In the case of epigenic karst systems, the most important karstification process is the solubility of carbon dioxide originated from the rainwater and soil, however, many other processes may play a role in the development of hypogenic karst systems. Active hypogenic processes are presently taking place in the Buda Thermal Karst System (BTKS) which is located at the border of confined and unconfined carbonates serving as the discharge zone of thermal water with different origin and temperature. These thermal karst environments offer diverse habitats for microorganisms having planktonic or biofilm forming lifestyles. Between 2012 and 2016, water, biofilm and sediment samples were collected in the Buda Thermal Karst System. Our study aimed to explore the morphological properties of biofilm samples related to the BTK area, discover the community structure of the discharging water and speleothems, and examine the structural changes of biofilm forming bacterial communities in the hypogenic karstification processes by creating and using a field experimental model system. The biofilm samples from different caves and spring caves of the BTK were examined using a scanning electron microscope, while the diversity of microbial communities was determined by molecular cloning and next-generation sequencing methods.

The biofilm samples were morphologically and taxonomically distinct in each study site compared to the water samples. This was also confirmed by the *in situ* experimental model system analyzing the natural biofilm formation. Although a significant part of the biofilm-forming taxa could not be identified due to the low sequence similarity matches, considering the metabolic characteristics of known species related to the detected OTUs, it can be assumed that thermophilic, anaerobic sulfate-, nitrate-, and iron(III)-reducing chemoorganotrophic as well as sulfur-, ammonia-, and nitrite-oxidizing chemolithotrophic taxa can establish complex metabolic networks in the speleothems and waters of BTK. This can be closely related to the specific environment provided by the BTKS, because mainly meso/thermophilic, chemotrophic prokaryotes are able to adapt to the aphotic, low organic content and geothermally heated environmental conditions typical in these caves. Consequently, the exploration of subterranean bacterial communities is extremely important for understanding the geomicrobiological processes of the BTKS, as well.

11. Felhasznált irodalom

- Aguiar P., Beveridge T.J., Reysenbach A.L. 2004. *Sulfurihydrogenibium azorense*, sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing microaerophile from terrestrial hot springs in the Azores. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(1): 33-39.
- Alföldi L. 1981. A budapesti geotermikus áramlási rendszer modellje (Model of the geothermal flow system in Budapest). *Hidrológiai Közlöny*. 61(9): 397-403.
- Alföldi L., Béteky L., Böcker T., Horváth J., Korim K., Liebe P., Rémi R. (szerk.). 1968. Budapest Hévízei (Thermal waters of Budapest). Vituki, Budapest, p. 365.
- Amann R., Lemmer H., Wagner M. 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology*. 25(3): 205-215.
- Anda D., Büki G., Krett G., Makk J., Márialigeti K., Eröss A., Mádl-Szőnyi J., Borsodi A.K. 2014. Diversity and morphological structure of bacterial communities inhabiting the Diana-Hygieia Thermal Spring (Budapest, Hungary). *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 61(3): 329-346.
- Anda D., Makk J., Krett G., Jurecska L., Márialigeti K., Mádl-Szőnyi J., Borsodi A.K. 2015. Thermophilic prokaryotic communities inhabiting the biofilm and well water of a thermal karst system located in Budapest (Hungary). *Extremophiles*. 19(4): 787-797.
- Anda D., Krett G., Makk J., Márialigeti K., Mádl-Szőnyi J., Borsodi A.K. 2017. Comparison of bacterial and archaeal communities from different habitats of the hypogenic Molnár János Cave of the Buda Thermal Karst System (Hungary). *Journal of Cave and Karst Studies*. 79(2): 113-121.
- Angert E.R., Northup D.E., Reysenbach A.L., Peek A.S., Goebel B.M., Pace N.R. 1998. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker Cave, Kentucky. *American Mineralogist*. 83(11): 1583-1592.
- Baker G.C., Smith J.J., Cowan D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal Microbiological Methods*. 55(3): 541-555.
- Banerjee S., Joshi S.R. 2013. Insights into cave architecture and the role of bacterial biofilm. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B. *Biological Sciences*. 83(3): 277-290.
- Barton H.A. 2006. Introduction to cave microbiology: A review for the non-specialist. *Journal of Cave and Karst Studies*. 68(2): 43-54.
- Barton H.A., Jurado V. 2007. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe-American Society for Microbiology*. 2(3): 132-138.
- Barton H.A., Northup D.E. 2007. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives. *Journal of Cave and Karst Studies*. 69(1): 163-178.
- Barton H.A. 2015. Starving artists: bacterial oligotrophic heterotrophy in caves. In: Engel A.S. (ed.) Microbial life of cave systems. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp.

- Baskar S., Baskar R., Lee N., Theophilus P.K. 2009. Speleothems from Mawsmi and Krem Phyllut caves, Meghalaya, India: some evidences on biogenic activities. *Environmental Geology*. 57(5): 1169-1186.
- Baskar S., Routh J., Baskar R., Kumar A., Miettinen H., Itävaara M. 2016. Evidences for microbial precipitation of calcite in speleothems from Krem Syndai in Jaintia Hills, Meghalaya, India. *Geomicrobiology Journal*. 33(10): 906-933.
- Blank C.E., Cady S.L., Pace N.R. 2002. Microbial composition of near-boiling silica-depositing thermal springs throughout Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(10): 5123-5135.
- Borsodi A.K., Knáb M., Krett G., Makk J., Márialigeti K., Eröss A., Mádl-Szőnyi J. 2012. Biofilm bacterial communities inhabiting the cave walls of the Buda Thermal Karst System, Hungary. *Geomicrobiology Journal*. 29(7): 611-627.
- Boyde A., Vesely P. 1972. Comparison of fixation and drying procedures for preparation of some cultured cell lines for examination in the SEM. *Scanning Electron Microscopy*. 1972: 265-272.
- Bray D.F., Bagu J., Koegler P. 1993. Comparison of hexamethyldisilazane (HMDS), Peldri II, and critical-point drying methods for scanning electron microscopy of biological specimens. *Microscopy Research and Technique*. 26(6): 489–495.
- Busato F., Tost J. 2015. DNA methylation analysis by pyrosequencing. In: Nelson K.E. (ed.) *Encyclopedia of Metagenomics. Genes, Genomes and Metagenomes: Basics, Methods, Databases and Tools*. Springer, New York, pp. 132-141.
- Cacchio P., Contento R., Ercole C., Cappuccio G., Preit Martinez M. Lepidi A. 2004. Involvement of microorganisms in the formation of carbonate speleothems in the cervo cave (L'Aquila-Italy). *Geomicrobiology Journal*. 21(8): 497–509.
- Cañaveras J.C., Hoyos M., Sanchez-Moral S., Sanz-Rubio E., Bedoya J., Soler V., Groth I., Schumann P., Laiz L., Gonzalez I., Saiz-Jimenez, C. 1999. Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain). *Geomicrobiology Journal*. 16(1): 9-25.
- Cañaveras J.C, Sanchez-Moral S., Soler V., Saiz-Jimenez C. 2001. Microorganisms and microbially induced fabrics in cave walls. *Geomicrobiology Journal*. 18(3): 223-240.
- Chafetz H.S. Buczynski C. 1992. Bacterally induced lithification of microbial mats. *Palaos*. 7: 277–293.
- Characklis W.G., Wilderer P.A. 1989. Structure and function of biofilms. In: *Structure and function of biofilms*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 46: 1–387.
- Chelius M.K, Moore J.C. 2004. Molecular phylogenetic analysis of Archaea and Bacteria in Wind Cave, South Dakota. *Geomicrobiology Journal*. 21(2): 123-134.

- Chelius M.K., Beresford G., Horton H., Quirk M., Selby G., Simpson R.T., Moore J.C. 2009. Impacts of alterations of organic inputs on the bacterial community within the sediments of Wind Cave, South Dakota, USA. *International Journal of Speleology*. 38(1): 1-10.
- Chen Y., Wu L., Boden R., Hillebrand A., Kumaresan D., Moussard H., Baciú M., Lu Y., Murrell J.C. 2009. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur-and ammonium-based chemolithotrophy in Movile Cave. *The ISME journal*. 3(9): 1093-1104.
- Cockell C.S., Kelly L.C., Summers S., Marteinsson V. 2011. Following the kinetics: Iron-oxidizing microbial mats in cold Icelandic volcanic habitats and their rock-associated carbonaceous signature. *Astrobiology*. 11(7): 679-694.
- Cuezva S., Fernandez-Cortes A., Porca E., Pašić L., Jurado V., Hernandez-Marine M., Serrano-Ortiz P., Hermosin B., Cañaveras J. C., Sanchez-Moral S., Saiz-Jimenez, C. 2012. The biogeochemical role of *Actinobacteria* in Altamira cave, Spain. *FEMS Microbiology Ecology*. 81(1): 281-290.
- Daniels R., Vanderleyden J., Michiels J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 28(3): 261-289.
- Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280(5361): 295-298.
- De la Torre J.R., Walker C.B., Ingalls A.E., Könneke M., Stahl D.A. 2008. Cultivation of a thermophilic ammonia oxidizing archaeon synthesizing crenarchaeol. *Environmental Microbiology*. 10(3): 810-818.
- Decho A.W. 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 28(7): 73–153.
- Dhami N.K., Mukherjee A., Watkin E.L. 2018. Microbial diversity and mineralogical-mechanical properties of calcitic cave speleothems *in natural* and *in vitro* biomineralization Conditions. *Frontiers in Microbiology*. 9(40): 1-22.
- Dobosy P., Sávolgy Z., Óvári M., Mádl-Szőnyi J., Záray G. 2016. Microchemical characterization of biogeochemical samples collected from the Buda Thermal Karst System, Hungary. *Microchemical Journal*. 124: 116-120.
- Dodsworth J.A., Hungate B.A., Hedlund B.P. 2011. Ammonia oxidation, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in two US Great Basin hot springs with abundant ammonia-oxidizing archaea. *Environmental Microbiology*. 13(8): 2371-2386.
- Dojka M.A., Hugenholtz P., Haack S.K., Pace N.R. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon-and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(10): 3869-3877.
- Donlan R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9): 881-890.
- Druschel G.K., Emerson D., Sutka R., Suchecki P., Luther G.W. 2008. Low-oxygen and

- chemical kinetic constraints on the geochemical niche of neutrophilic iron (II) oxidizing microorganisms. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 72 (14): 3358–3370.
- Eder W., Huber R. 2002. New isolates and physiological properties of the Aquificales and description of *Thermocrinis albus* sp. nov. *Extremophiles*. 6(4): 309-318.
- Ehrich S., Behrens D., Lebedeva E., Ludwig W., Bock E. 1995. A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Archives of Microbiology*. 164(1): 16-23.
- Ehrlich H.L. 2002. Geomicrobiology (4th edition). Marcel Dekker, New York. pp. 122-123.
- Ehrlich H.L., Newman D.K. 2009. Geomicrobiology (5th edition). CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, pp. 233-242.
- Engel A.S., Lee N., Porter M.L., Stern L.A., Bennett P.C., Wagner M. 2003. Filamentous Epsilonproteobacteria dominate microbial mats from sulfidic cave springs. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(9):5503-5511.
- Engel A.S., Porter M.L., Stern L.A., Quinlan S., Bennett P.C. 2004a. Bacterial diversity and ecosystem function of filamentous microbial mats from aphotic (cave) sulfidic springs dominated by chemolithoautotrophic “Epsilonproteobacteria”. *FEMS Microbiology Ecology*. 51(1): 31-53.
- Engel A.S., Stern L.A., Bennett P.C. 2004b. Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis. *Geology*. 32(5): 369-372.
- Engel A.S. 2007. Observations on the biodiversity of sulfidic karst habitats. *Journal of Cave and Karst Studies*. 69(1): 187-206.
- Engel A.S., Meisinger D.B., Porter M.L., Payn R.A., Schmid M., Stern L.A., Lee N.M. 2010. Linking phylogenetic and functional diversity to nutrient spiraling in microbial mats from Lower Kane Cave (USA). *The ISME Journal*. 4(1): 98-110.
- Engel A.S. 2011. Karst ecosystems. In: Reitner J, Thiel V. (eds.) *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Encyclopedia of Earth Sciences Series (EESS, formerly Kluwer Edition), Berlin, pp. 521–553.
- Engel A.S. 2012. Chemoautotrophy. In: White W.B., Culver D.C (eds.) *Encyclopedia of Caves* (2nd edition). Elsevier, pp. 125-134.
- Enyedi N.T. 2016. Sugárrezisztens baktériumok a Diana-Hygieia termálforrásban képződött biofilmből. *Tudományos Diákköri Dolgozat*. ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék.
- Enyedi N.T., Anda D., Borsodi A.K., Szabó A., Pál S.E., Óvári M., Márialigeti K., Kovács-Bodor P., Mádl-Szőnyi J., Makk J. 2019. Radioactive environment adapted bacterial communities constituting the biofilms of hydrothermal spring caves (Budapest, Hungary). *Journal of Environmental Radioactivity*. 203: 8-17.
- Ercole C., Cacchio P., Botta A.L., Centi V., Lepidi A. 2007. Bacterially induced mineralization of calcium carbonate: the role of exopolysaccharides and capsular polysaccharides. *Microscopy and Microanalysis*. 13(1): 42-50.

- Erőss A., Mádl-Szőnyi J., Csoma A.É. 2008. Characteristics of discharge at Rose and Gellért Hills, Budapest, Hungary. *Central European Geology*. 51(3): 267-281.
- Erőss A. 2010. Characterization of fluids and evaluation of their effects on karst development at the Rózsadomb and Gellért Hill, Buda Thermal Karst Hungary. *Ph.D. Thesis*. ELTE Department of Physical and Applied Geology.
- Erőss A., Mádl-Szőnyi J., Surbeck H., Horváth Á., Goldscheider N., Csoma A.É. 2012. Radionuclides as natural tracers for the characterization of fluids in regional discharge areas, Buda Thermal Karst, Hungary. *Journal of Hydrology*. 426: 124-137.
- Erőss A. 2016. Hipogén karsztok hazánkban – A Villányi és a Budai termálkarszt kutatása. Tudományos Kutatás Napja, Budapest, 2016.február 5.
- Ferrer R.M., Quevedo-Sarmiento J., Rivadeneyra M.A., Bejar V., Delgado R. Ramos-Cormenzana A. 1988. Calcium carbonate precipitation by two groups of moderately halophilic microorganisms at different temperatures and salt concentrations. *Current Microbiology*. 17(4): 221–227.
- Fleming E.J., Langdon A.E., Martinez-Garcia M., Stepanauskas R., Poulton N.J., Masland E. D.P., Emerson D. 2011. What's new is old: resolving the identity of *Leptothrix ochracea* using single cell genomics, pyrosequencing and FISH. *PLoS One*. 6(3): e17769.
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S.A., Kjelleberg S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 14(9): 563-575.
- Fodor L., Magyari Á., Fogarasi A., Palotás K. 1994. Tercier szerkezetfejlődés és késő paleogén üledékképződés a Budai-hegységben. A Budai-vonal új értelmezése. *Földtani Közlöny*. 142 (2): 129-305.
- Forti P., Galdenzi S., Sarbu S.M. 2002. The hypogenic caves: a powerful tool for the study of seeps and their environmental effects. *Continental Shelf Research*. 22(16): 2373-2386.
- Fuerst J.A., Sagulenko E. 2011. Beyond the bacterium: planctomycetes challenge our concepts of microbial structure and function. *Nature Reviews Microbiology*. 9(6): 403-413.
- Gaálová B., Donauerová A., Seman M., Bujdáková H. 2014. Identification and β -lactam resistance in aquatic isolates of *Enterobacter cloacae* and their status in microbiota of Domica Cave in Slovak Karst (Slovakia). *International Journal of Speleology*. 43(1): 69-77.
- Galdenzi S., Jones D.S. 2017. The Frasassi Caves: A “classical” active hypogenic cave. In: Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Auler A.S., Audra P. (eds.) Hypogene karst regions and caves of the world. Springer, Cham, pp. 143-159.
- Gault A.G., Ibrahim A., Langley S., Renaud R., Takahashi Y., Boothman C., Lloyd J.R., Clark I.D., Ferris F.G., Fortin D. 2011. Microbial and geochemical features suggest iron redox cycling within bacteriogenic iron oxide-rich sediments. *Chemical Geology*. 281(1): 41-51.

- Goldscheider N., Mádl-Szőnyi J., Erőss A., Schill E. 2010. Review: Thermal water resources in carbonate rock aquifers. *Hydrogeology Journal*. 18(6): 1303-1318.
- Gonzalez J.M., Portillo M.C., Saiz-Jimenez C. 2006. Metabolically active Crenarchaeota in Altamira Cave. *Naturwissenschaften*. 93(1): 42-45.
- Groth I., Schumann P., Laiz L., Sanchez-Moral S., Cañaveras J.C., Saiz-Jimenez C. 2001. Geomicrobiological study of the Grotta dei Cervi, Porto Badisco, Italy. *Geomicrobiology Journal*. 18(3): 241-258.
- Hamilton T.L., Jones D.S., Schaperdoth I., Macalady J.L. 2015. Metagenomic insights into S (0) precipitation in a terrestrial subsurface lithoautotrophic ecosystem. *Frontiers in Microbiology*. 5: 756.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. 2001. PAST-palaeontological statistics, ver. 1.89. *Palaeontologia Electronica*. 4(1): 1-9.
- Hedlund B.P., Dodsworth J.A., Murugapiran S.K., Rinke C., Woyke T. 2014. Impact of single-cell genomics and metagenomics on the emerging view of extremophile “microbial dark matter”. *Extremophiles*. 18(5): 865-875.
- Hill, C.A. P. Forti. 1997. Cave Minerals of the World. National Speleological Society. Huntsville, Alabama, USA, p.463.
- Hirayama H., Takai K., Inagaki F., Yamato Y., Suzuki M., Nealson K.H., Horikoshi K. 2005. Bacterial community shift along a subsurface geothermal water stream in a Japanese gold mine. *Extremophiles*. 9(2): 169-184.
- Holmes A.J., Tujula N.A., Holley M., Contos A., James J.M., Rogers P., Gillings M.R. 2001. Phylogenetic structure of unusual aquatic microbial formations in Nullarbor caves, Australia. *Environmental Microbiology*. 3(4): 256-264.
- Hugenholtz P., Goebel B.M., Pace N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of Bacterial diversity. *Journal of Bacteriology*. 180(18): 4765-4774.
- Jakucs L. 1971. A karsztok morfogenetikája. A karsztfejlődés variációi. Akadémiai Kiadó, Budapest, p. 312.
- Jakucs L. 1994. A Budai-hegység hidrotermális karsztja (The hydrothermal karst of Buda Mountains). *Földrajzi Értesítő*. 43(3-4): 235-246.
- Jefferson K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*. 236(2): 163-173.
- Johnston M.D., Muench B.A., Banks E.D., Barton H.A. 2012. Human urine in Lechuguilla Cave: the microbiological impact and potential for bioremediation. *Journal of Cave and Karst Studies*. 74(3): 278-291.
- Jones D.S., Albrecht H.L., Dawson K.S., Schaperdoth I., Freeman K.H., Pi Y., Pearson A., Macalady J.L. 2012. Community genomic analysis of an extremely acidophilic sulfur-oxidizing biofilm. *The ISME Journal*. 6(1): 158-170.

- Jones D.S. 2015. Methods for characterizing microbial communities in caves and karst: a review. In: Engel A.S. (ed.) *Microbial life of cave systems*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 23-46.
- Jones D.S., Schaperdoth I., Macalady J.L. 2016. Biogeography of sulfur-oxidizing *Acidithiobacillus* populations in extremely acidic cave biofilms. *The ISME Journal*. 10(12): 2879-2891.
- Jurado V, Gonzalez J.M, Laiz L, Saiz-Jimenez C. 2006. *Aurantimonas altamirensis* sp. nov., a member of the order Rhizobiales isolated from Altamira Cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(11): 2583–2585.
- Kawaichi S., Ito N., Kamikawa R., Sugawara T., Yoshida T., Sako Y. 2013. *Ardenticatena maritima* gen. nov., sp. nov., a ferric iron-and nitrate-reducing bacterium of the phylum ‘*Chloroflexi*’ isolated from an iron-rich coastal hydrothermal field, and description of *Ardenticatena* classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 63(8): 2992-3002.
- Kawaichi S., Yamada T., Umezawa A., McGlynn S. E., Suzuki T., Dohmae N., Yoshida T., Sako Y., Matsushita N., Hashimoto K., Nakamura R. 2018. Anodic and cathodic extracellular electron transfer by the filamentous bacterium *Ardenticatena maritima* 110S. *Frontiers in Microbiology*. 9(68):1-11.
- Kim O.S., Cho Y.J., Lee K., Yoon S.H., Kim M., Na H., Park S.C., Jeon Y.S., Lee J.H., Yi H., Won S., Chun J. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62(3): 716-721.
- Kimura S, Bryan C.G, Hallberg K.B, Johnson D.B. 2011. Biodiversity and geochemistry of an extremely acidic, low-temperature subterranean environment sustained by chemolithotrophy. *Environmental Microbiology*. 13(8): 2092–2104.
- Kindaichi T., Yuri S., Ozaki N., Ohashi A. 2012. Ecophysiological role and function of uncultured Chloroflexi in an anammox reactor. *Water Science and Technology*. 66(12): 2556-2561.
- Klimchouk A.B. 2007. Hypogene speleogenesis: Hydrogeological and morphogenetic perspective special paper no.1. National Cave and Karst Research Institute, Carlsbad, NM, p. 106.
- Klindworth A., Pruesse E., Schweer T., Peplies J., Quast C., Horn M., Glöckner F.O. 2013. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*. 41(1):e1.
- Kojima H., Fukui, M. 2014. *Sulfurisoma sediminicola* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(5): 1587-1592.
- Könneke M., Bernhard A.E., José R., Walker C.B., Waterbury J.B., Stahl D.A. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*. 437(7058): 543-546.

- Kostanjšek R., Pašić, L., Daims, H., Sket, B. 2013. Structure and community composition of sprout-like bacterial aggregates in a Dinaric karst subterranean stream. *Microbial Ecology*. 66(1): 5-18.
- Kotiranta A.K., Ito H., Haapasalo M.P., Lounatmaa K. 1999. Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer. *FEMS Microbiology Letters*. 179(2): 275–280.
- Kovács-Bodor P., Csondor K., Erőss A., Szieberth D., Freiler-Nagy Á., Horváth Á., Bihari Á., Mádl-Szőnyi J. 2019. Natural radioactivity of thermal springs and related precipitates in Gellért Hill area, Buda Thermal Karst, Hungary. *Journal of Environmental Radioactivity*. 201: 32-42.
- Kovács J., Erőss A. 2017. Statistically optimal grouping using combined cluster and discriminant analysis (CCDA) on a geochemical database of thermal karst waters in Budapest. *Applied Geochemistry*. 84: 76-86.
- Kovács J., Müller P. 1980. A budai-hegyek hévizes tevékenységének kialakulása és nyomai (Evolution and evidence of the thermal water activity in the Buda Hills). *Karszt és Barlang*. 2: 93-98.
- Krett G., Nagymáté Z., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2016. Seasonal and spatial changes of planktonic bacterial communities inhabiting the natural thermal Lake Hévíz, Hungary. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 63(1): 115-130.
- Krett G. 2017. A Hévízi-tó különleges élőhelyi sajátosságaihoz alkalmazkodott baktériumközösségek diverzitása. *Doktori értekezés*. ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék.
- Krett G., Szabó A., Felföldi T., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2017. The effect of reconstruction works on planktonic bacterial diversity of a unique thermal lake revealed by cultivation, molecular cloning and next generation sequencing. *Archives of Microbiology*. 199(8): 1077-1089.
- Krumbein W.E. 1979. Photolithotrophic and chemoorganotrophic activity of bacteria and algae as related to beachrock formation and degradation (Gulf of Aqaba, Sinai) *Geomicrobiology Journal*. 1(2): 139–203.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33(7): 1870-1874.
- Kumaresan D., Wischer D., Stephenson J., Hillebrand-Voiculescu A., Murrel J.C. 2014. Microbiology of Movile Cave – a chemolithoautotrophic ecosystem. *Geomicrobiology Journal*. 31(3): 186-193.
- Kuypers M.M., Sliekers A.O., Lavik G., Schmid M., Jørgensen B.B., Kuenen J.G., Sinninghe Damsté J.S., Strous M., Jetten M. S. 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*. 422(6932): 608-611.
- Kuzmann E., Homonnay Z., Kovács K., Zsabka P., Erőss A., Mádl-Szőnyi J. 2014. Mössbauer study of biofilms formed at spring caves of Buda Karst, Hungary. *Hyperfine Interactions*. 226(1-3): 571–577.

- Lane D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, pp 115–149.
- Lavoie K.H., Northup D.E., Barton H.A. 2010. Microbe-mineral interactions: cave geomicrobiology. In: Jain S.K., Khan A.A., Rai M.K. (eds.) Geomicrobiology. CRC Press, pp 1-46.
- Lebedeva E.V., Off S., Zumbärgel S., Kruse M., Shagzhina A., Lückner S., Maixner F., Lipski A., Daims H., Spieck E. 2011. Isolation and characterization of a moderately thermophilic nitrite-oxidizing bacterium from a geothermal spring. *FEMS Microbiology Ecology*. 75 (2): 195-204.
- Lee N., Liebl W., Engel A.S., Porter M. 2015. Caves biofilm metagenomics. In: Rodriguez-Valera F., Highlander S.K., White B.A. (eds.) Encyclopedia of Metagenomics: Environmental metagenomics. Springer, New York, pp. 65-74.
- Leél-Össy Sz. 1995. A budai Rózsadomb és környékének különleges barlangjai. (Special caves of Rózsadomb on Buda and its environs.) *Földtani Közlöny*. 125(3-4): 363-432.
- Leél-Össy Sz. 1997. A József-hegyi-barlang (Budapest) termálkarsztos keletkezése és fejlődése. *Kandidátusi értekezés*, MTA.
- Leél-Össy Sz., Surányi G. 2003. Peculiar hydrothermal caves in Budapest, Hungary. *Acta Geologica Hungarica*. 46(4): 407-436.
- Leél-Össy Sz. 2017. Caves of the Buda Thermal Karst. In Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Audra P. (eds.) Hypogene Karst Regions and Caves of the World. Springer, Cham, pp. 279-297.
- Legatzki A., Ortiz M., Neilson J.W., Dominguez S., Andersen G.L., Toomey R.S., Pryor B.M., Pierson L.S., Maier R.M. 2011. Bacterial and archaeal community structure of two adjacent calcite speleothems in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Geomicrobiology Journal*. 28(2): 99-117.
- Little B., Wagner P., Ray R., Pope R., Scheetz R. 1991. Biofilms: an ESEM evaluation of artifacts introduced during SEM preparation. *Journal of Industrial Microbiology*. 8(4): 213–222.
- Ma L., Conover M., Lu H., Parsek M.R., Bayles K., Wozniak D.J. 2009. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogens*. 5(3): e1000354.
- Macalady J.L., Dattagupta S., Schaperdorth I., Jones D.S., Druschel G.K., Eastman D. 2008. Niche differentiation among sulfur-oxidizing bacterial populations in cave waters. *The ISME Journal*. 2(6): 590-601.
- Macalady J.L., Lyon E.H., Koffman B., Albertson L.K., Meyer K., Galdenzi S., Mariani S. 2006. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(8):5596-5609.
- Macalady J.L., Jones D.S., Lyon E.H. 2007. Extremely acidic, pendulous cave wall biofilms from the Frasassi cave system, Italy. *Environmental Microbiology*. 9(6): 1402-1414.

- Mádl-Szőnyi J. 2013. A Budai Termálkarszt rendszer jellemzői. In: Mindszenty A. (szerk.) Földtani értékek és az ember, városgeológiai tanulmányok 2013, „In urbe et prourbe”. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 79-104.
- Mádl-Szőnyi J. 2015. Genesis and utilization of thermal flow in deep carbonate systems. In: Stevanovic Z. (ed.) Karst aquifers – Characterization and engineering. Springer International Publishing, Cham, pp. 654-667.
- Mádl-Szőnyi J., Tóth Á. 2015. Basin-scale conceptual groundwater flow model for an unconfined and confined thick carbonate region. *Hydrogeology Journal*. 23(7): 1359-1380.
- Mádl-Szőnyi J., Erőss A., Tóth Á. 2017. Fluid Flow Systems and Hypogene Karst of the Transdanubian Range, Hungary—With Special Emphasis on Buda Thermal Karst. In Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Audra P. (eds.) Hypogene Karst Regions and Caves of the World. Springer, Cham, pp. 267-278.
- Mádlné Szőnyi J., Erőss A., Havril T., Poros Zs., Győri O., Tóth Á., Csoma A., Ronchi P., Mindszenty A. 2018. Fluidumok, áramlási rendszerek és ásványtani lenyomataik összefüggései a Budai-termálkarszton. *Földtani Közlöny*. 148(1): 75-96.
- Madsen J.S., Burmølle M., Hansen L.H., Sørensen S.J. 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 65(2): 183-195.
- Makk J., Tóth E., Anda D., Pál S., Schumann P., Kovács A.L., Mádl-Szőnyi J., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2016. *Deinococcus budaensis* sp. nov., a mesophilic species isolated from biofilm sample of a hydrothermal spring cave. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66(12): 5345-5351.
- Marks C.R., Stevenson B.S., Rudd S., Lawson P.A. 2012. Nitrospira dominated biofilm within a thermal artesian spring: a case for nitrification-driven primary production in a geothermal setting. *Geobiology*. 10(5):457–466.
- Meisinger D.B., Zimmermann J., Ludwig W., Schleifer K.H., Wanner G., Schmid M., Bennett P.C., Engel A.S., Lee N. M. 2007. *In situ* detection of novel Acidobacteria in microbial mats from a chemolithoautotrophically based cave ecosystem (Lower Kane Cave, WY, USA). *Environmental Microbiology*. 9(6): 1523-1534.
- Melim L.A., Northup D.E., Spilde M.N., Jones B., Boston P.J., Bixby R.J. 2008. Reticulated filaments in cave pool speleothems: microbe or mineral. *Journal of Cave and Karst Studies*. 70(3): 135-141.
- Mindszenty A. 2013. Geológiai adottságok. In: Mindszenty A. (szerk.) Földtani értékek és az ember, városgeológiai tanulmányok 2013, „In urbe et prourbe”. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 17-40.
- Miseta R. 2012. A Harkányi Gyógyfürdő termelőkútjainak kénes karsztvizében előforduló baktériumközösségek filogenetikai diverzitása. *Doktori értekezés*. ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék.

- Miseta R., Palatinszky M., Makk J., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2012. Phylogenetic diversity of bacterial communities associated with sulfurous karstic well waters of a Hungarian spa. *Geomicrobiology Journal*. 29(2): 101-113.
- Miseta R., Palatinszky M., Makk J., Márialigeti K., Borsodi A. 2013. Spatial and temporal changes of bacterial communities inhabiting the well waters of Harkány spa. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 60(3): 329-343.
- Mulec J., Krištůfek V., Chroňáková A. 2012. Comparative microbial sampling from eutrophic caves in Slovenia and Slovakia using RIDA® COUNT test kits. *International Journal of Speleology*. 41(1): 1-8.
- Nelson W.C., Stegen J.C. 2015. The reduced genomes of *Parcubacteria* (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Frontiers in Microbiology*. 6: 713.
- Northup D.E., Lavoie K.H. 2001. Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology Journal*. 18(3): 199-222.
- Northup D.E., Barns S.M., Yu L.E., Spilde M.N., Schelble R.T., Dano K.E., Dahm C.N. 2003. Diverse microbial communities inhabiting ferromanganese deposits in Lechuguilla and Spider Caves. *Environmental Microbiology*. 5(11): 1071-1086.
- Oksanen J.F., Blanchet G., Friendly M., Kindt R., Legendre P., McGlinn D., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.M., Szoecs E., Wagner H. 2018. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-3. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Onac B.P., Drăgușin V. 2017. Hypogene Caves of Romania. In: Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Auler A.S., Audra P. (eds.) Hypogene karst regions and caves of the world. Springer, Cham, pp. 257-265.
- Ortiz M., Legatzki A., Neilson J.W., Fryslye B., Nelson W.M., Wing R.A., Maier, R.M. 2014. Making a living while starving in the dark: metagenomic insights into the energy dynamics of a carbonate cave. *The ISME Journal*. 8(2): 478-491.
- Ortiz M., Neilson J.W., Legatzki A., Maier R.M. 2015. Bacterial and archaeal diversity on cave speleothem and rock surfaces: A carbonate cave case study from Kartchner Caverns. In: Engel A.S. (ed.) Microbial Life of Cave Systems. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 105–123.
- Pace N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*. 276(5313): 734-740.
- Pachiadaki M.G., Lykousis V., Stefanou E.G., Kormas, K. A. 2010. Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiology Ecology*. 72(3): 429-444.
- Pál S. 2015. A Budai Termálkarsztban található Rudas-fürdő Török-forrásában élő radioaktív rezisztens baktériumok kimutatása. *Diplomamunka*. ELTE TTK, Mikrobiológiai Tanszék.
- Palmer A.N., Palmer M.V. 2000. Hydrochemical interpretation of cave patterns in the Guadalupe Mountains, New Mexico. *Journal of Cave and Karst Studies*. 62(2): 91-108.

- Palmer A.N. 2007. Cave Geology. Dayton, Ohio, Cave Books. p. 454.
- Palmer A.N. 2017. Hypogenic versus epigenic aspects of the Black Hills Caves, South Dakota. In: Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Auler A.S., Audra P. (eds.) Hypogene karst regions and caves of the world. Springer, Cham, pp. 601-615.
- Palmer M.V., Palmer A.N., Davis D.G. 2017. Sulfuric acid caves of the Bighorn Basin, Wyoming. In: Klimchouk A., Palmer A.N., Waele J.D., Auler A.S., Audra P. (eds.) Hypogene karst regions and caves of the world. Springer, Cham, pp. 591-599.
- Palotai M., Mádlné Szőnyi J., Horváth Á. 2005. A budapesti Gellért- és a József-hegy felszín alatti vizeiben mért radon- és rádiumtartalom lehetséges forrásai. *Általános Földtani Szemle*. 29:25-40.
- Papp F. 1942. Budapest meleg gyógyforrásai. A Budapesti Központi Gyógy- és Üdülőhelyi Bizottság Rheuma és Fürdő-kutató Inzézet, Budapest.
- Pašić L, Kovce B, Sket B, Herzog-Velikonja B. 2009. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a Karstic cave in Slovenia. *FEMS Microbiology Ecology*. 71:50-60.
- Paterson A., Engel A.S. 2015. Predicting bacterial diversity in caves associated with sulfuric acid speleogenesis. In: Engel A.S. (ed.) Microbial Life of Cave Systems. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 193–214.
- Pleše B., Pojskić N., Ozimec R., Mazija M. 2016. Molecular characterization of aquatic bacterial communities in Dinaric Range Caves. *Water Environment Research*. 88(7): 617-629.
- Polyak V.J., McIntosh W.C., Güven N., Provencio P. 1998. Age and origin of Carlsbad Cavern and related caves from 40Ar/39Ar of alunite. *Science*. 279(5358): 1919-1922.
- Porter M.L., Engel A.S. 2008. Diversity of uncultured Epsilonproteobacteria from terrestrial sulfidic caves and springs. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(15): 4973-4977.
- Porter M.L, Engel A.S, Kane T.C, Kinkle B.K. 2009. Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic karst systems. *International Journal of Speleology*. 38(1): 27-40.
- Portillo M.C., Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C. 2008. Metabolically active microbial communities of yellow and grey colonizations on the walls of Altamira Cave, Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 104: 681–691.
- Pruesse E., Peplies J., Glöckner F.O. 2012. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*. 28(14): 1823-1829.
- Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies G., Glöckner F.O. 2013. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*. 41(D1): D590-D596.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/>.

- Rickard A.H., Gilbert P., High N.J., Kolenbrander P.E., Handley P.S. 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*. 11(2): 94-100.
- Rohwerder T., Sand W., Lascu C. 2003. Preliminary evidence for a sulphur cycle in Movile Cave, Romania. *Engineering in Life Sciences*. 23(1): 101-107.
- Rosetti S., Blackall L.L., Levantesi C., Uccelletti D., Tandoi V. 2003. Phylogenetic and physiological characterization of a heterotrophic, chemolithotrophic *Thiothrix* strain isolated from activated sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53(5): 1271-1276.
- Rusznayák A., Akob D.M., Nietzsche S., Eusterhues K., Totsche K.U., Neu T.R., Frosche T., Poppe J., Keinere R., Geletneky J., Katzschnmann L., Schulze E.D., Küsel K. 2011. Calcite biomineralization by bacterial isolates from the recently discovered pristine karstic Herrenberg Cave. *Applied and Environmental Microbiology*. 78(4): 1157–1167.
- Saiz-Jimenez C. 1999. Actinomycetes in hypogean environments. *Geomicrobiology Journal*. 16(1): 1-8.
- Saiz-Jimenez C. 2015. The microbiology of show caves, mines, tunnels, and tombs: implications for management and conservation. In: Engel A.S. (ed.) *Microbial Life of Cave Systems*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 231-261.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual. *Quarterly Review of Biology*. 76(3): 348-349.
- Sarbu S.M., Dane T.C., Kinkle B.K. 1996. A chemoautotrophically based cave systems. *Science*. 272(5270): 1953-1955.
- Sásdi L., Virág M. 2013. Ferenc-hegyi-barlang – egy újabb hévizes barlang. In: Mindszenty A. (szerk.) *Földtani értékek és az ember, városgeológiai tanulmányok 2013, „In urbe et prourbe”*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 223-226.
- Sawayama M., Suzuki T., Hashimoto H., Kasai T., Furutani M., Miyata N., Kunoh H. Takada J. 2011. Isolation of a *Leptothrix* strain, OUMS1, from ochreous deposits in groundwater. *Current Microbiology*. 63(2): 173-180.
- Schafarzik F. 1926. A Szent Gellérthegy geológiai múltja és jelene. *Természettudományi Közlöny*. 58: 460-472.
- Schafarzik F. 1928. Visszapillantás a budai hévforrások fejlődéstörténetére (The evolution of thermal springs in Buda). *Hidrológiai Közlöny*. 1: 9-14.
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R. A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(23): 7537-7541.
- Schuster S.C. 2007. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*. 5(1): 16-18.

- Seman M., Gaálová B., Cíchová M., Prokšová M., Haviarová D., Fláková R. 2015. The occurrence of coliform bacteria in the cave waters of Slovak Karst, Slovakia. *Folia Microbiologica*. 60(3): 269–278.
- Simões M., Simoes L.C., Vieira M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 43(4): 573-583.
- Stackebrandt E., Goebel BM. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44(4):846–849.
- Szabó A., Korponai K., Kerepesi C., Somogyi B., Vörös L., Bartha D., Márialigeti K., Felföldi T. 2017. Soda pans of the Pannonian steppe harbor unique bacterial communities adapted to multiple extreme conditions. *Extremophiles*. 21(3): 639-649.
- Takács-Bolner K., Kraus S. 1989. A melegvizes eredetű barlangok kutatásának eredményei (Results of research into caves with thermal water origins). *Karszt és Barlang*. I–II: 61–66.
- Takai K. 2011. Physiology. In: Horikoshi K., Antranikian G., Bull A.T., Robb F.T., Stetter K.O. (eds.) *Extremophiles handbook*. Springer Science & Business Media, Berlin p.1047.
- Tetu S.G., Breakwell K., Elbourne L.D., Holmes A.J., Gillings M.R., Paulsen I.T. 2013. Life in the dark: metagenomic evidence that a microbial slime community is driven by inorganic nitrogen metabolism. *The ISME Journal*. 7(6): 1227-1236.
- Tetu S.G., Elbourne L.D., Cronan A., Holmes A.J., Gillings M.R., Paulsen I.T. 2015. Microbial slime curtain communities of the Nullarbor Caves. In: Engel A.S. (ed.) *Microbial Life of Cave Systems*. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston, pp. 125-136.
- Tindall B. J., Rosselló-Mora R., Busse, H.J., Ludwig W., Kämpfer P. 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60(1): 249-266.
- Tolker-Nielsen T., Molin S. 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*. 40(2): 75-84.
- Van Veen W.L., Mulder E.G., Deinema M.H. 1978. The *Sphaerotilus-Leptothrix* group of bacteria. *Microbiological Reviews*. 42(2): 329.
- Vaneechoutte M., Rossau R., De Vos P., Gillis M., Janssens D., Paepe N., De Rouck A., Fiers T., Claeys G., Kersters K. 1992. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiology Letters*. 93(3): 227-233.
- Vendel M., Kisházi P. 1964. Összefüggések melegforrások és karsztvizek között a Dunántúli-Középhegységben megfigyelt viszonyok alapján (Relation between karstwaters and thermal springs by examples from the Transdanubian Central Range). *Hungarian Academy of Sciences*. Budapest.
- Virág M., Leél-Össy Sz., Mindszenty A. 2013a. Szpeleológiai adottságok. A felszín alatti víz oldóhatásának tanúi: A Budai barlangok. In: Mindszenty A. (szerk.) *Földtani értékek és az*

- ember, városgeológiai tanulmányok 2013, „In urbe et prourbe”. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 105-111.
- Virág M., Mindszenty A., Leél-Össy Sz., Surányi G. 2013b. Gellérthegy-i-aragonitbarlang. In: Mindszenty A. (szerk.) Földtani értékek és az ember, városgeológiai tanulmányok 2013, „In urbe et prourbe”. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, pp. 181-186.
- Vlamakis H., Chai Y., Beauregard P., Losick R., Kolter R. 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*. 11(3): 157-168.
- Waters C.M., Bassler B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 21: 319-346.
- Weidler G.W., Dornmayr-Pfaffenhuemer M., Gerbl F.W., Heinen W., Stan-Lotter H. 2007. Communities of Archaea and Bacteria in a subsurface radioactive thermal spring in the Austrian Central Alps, and evidence of ammonia-oxidizing Crenarchaeota. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1): 259-270.
- Wickham H. 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York.
- Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. 1999. What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (eds.) Microbial Extracellular Polymeric Substances. Characterization, Structure and Function. Springer, Berlin, pp. 1-19.
- Wu Y., Tan L., Liu W., Wang B., Wang J., Cai Y., Lin X. 2015. Profiling bacterial diversity in a limestone cave of the western Loess Plateau of China. *Frontiers in Microbiology*. 6: 244.
- Yamada T., Sekiguchi Y., Hanada S., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Kamagata Y. 2006. *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum *Chloroflexi*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(6): 1331-1340.
- Yamada T., Imachi H., Ohashi A., Harada H., Hanada S., Kamagata Y., Sekiguchi Y. 2007. *Bellilinea caldifistulae* gen. nov., sp. nov. and *Longilinea arvoryzae* gen. nov., sp. nov., strictly anaerobic, filamentous bacteria of the phylum *Chloroflexi* isolated from methanogenic propionate-degrading consortia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57(10): 2299-2306.
- Yang L., Hu Y., Liu Y., Zhang J., Ulstrup J., Molin S. 2011. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Environmental Microbiology*. 13(7): 1705-1717.
- Zhao W., Song Z., Jiang H., Li W., Mou X., Romanek C.S., Wiegel J., Dong H., Zhang C.L. 2011. Ammonia-oxidizing Archaea in Kamchatka hot springs. *Geomicrobiology Journal*. 28(2): 149-159.
- Zsigmondy V. 1878. A városligeti artézi kút budapesten. *Légrády Testvérek*.

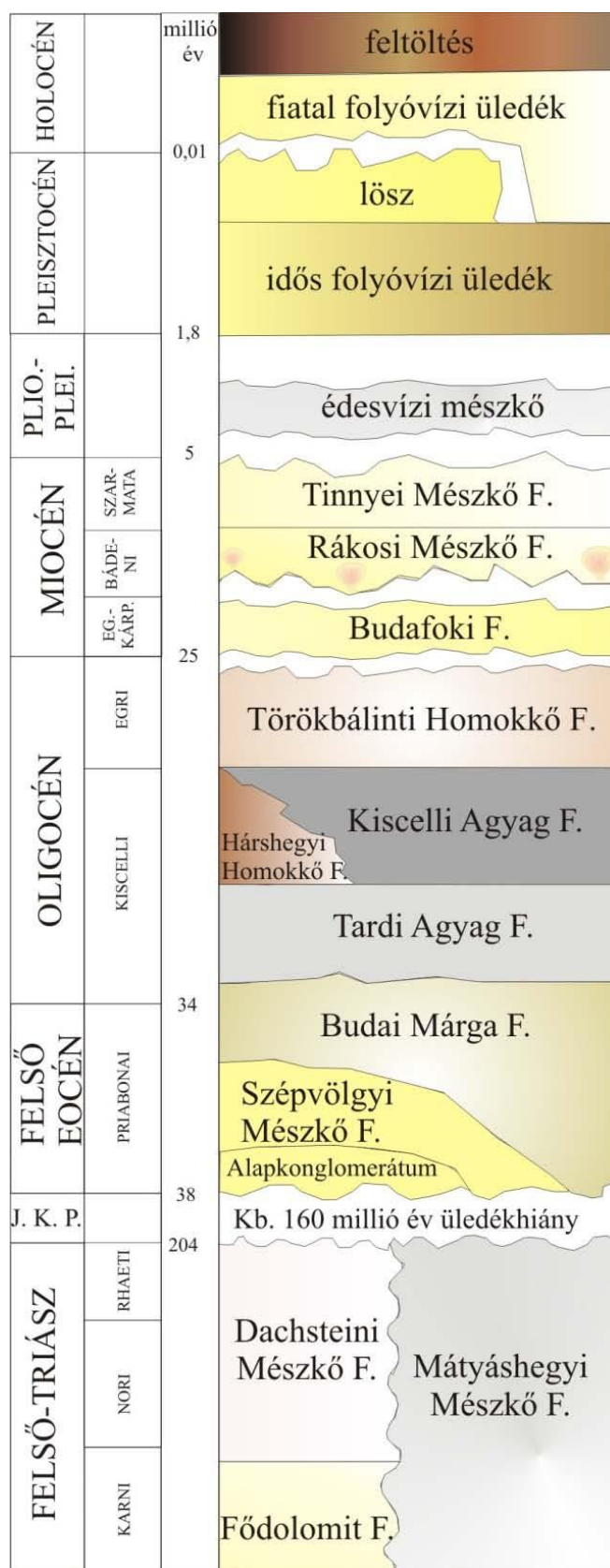
Internetes hivatkozások

www.termeszetvedelem.hu

http://fovarosi.blog.hu/2008/12/04/a_molnar_janos_barlang

<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>

12. Függelék



1. ábra. A Budai-hegység rétegsora (Török, 2007)

1. táblázat. A BTK északi és déli rendszeréhez tartozó források és forrásbarlangok vizeinek főbb fizikai és kémiai paraméterei a 2012-es mintavétel során

	Molnár János-barlang	Városligeti kút	Gellért Ósforrás	Diana-Hygieia-forrás	Rudas-fürdő Török-forrás	Rác-fürdő Nagy-forrás
Víz hőmérséklet (°C)	20.1	73.7	29.6	29.1	38.7	37.6
pH	6.9	6.2	7.0	7.0	6.8	6.7
m-lúgosság (mval/L)	6.2	8.2	7.8	7.7	8.9	8.1
Sótartalom (mg/L)	792	1126	1266	1212	1218	1232
IC (mg/L)	49.6	78.2	83.0	70.0	130.0	76.0
TOC (mg/L)	1.4	1.7	2.0	6.4	0.8	1.1
TN (mg/L)	1.8	0.7	0.9	0.4	0.4	0.4
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	<0,01	0.16	0.14	<0,01	0.06	<0,01
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	0.007	<0,010	0.017	0.011	0.076	<0,010
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	1.7	<0,2	0.5	<0,2	<0,2	<0,2
KOI (O ₂ mg/L)	<5	<5	<5	<5	<5	<5
Cl ⁻ (mg/L)	37	170	137	122	142	114
Fe (mg/L)	0.08	0.17	0.08	0.18	0.04	0.17
Fajl. elektr. vezkép (μS/cm) 20°C	1006	1655	1808	1708	1715	1735
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	121	215	369	362	350	335
Keménység (nK°)	23.0	24.6	31.9	30.8	34.5	33.0
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	<0,01	<0,01	0.01	0.09	1.42	<0,01

2. táblázat. A BTK északi megcsapolódási rendszeréhez tartozó Molnár János-barlangot kitöltő vizek főbb fizikai és kémiai paraméterei a 2014-es mintavétel során

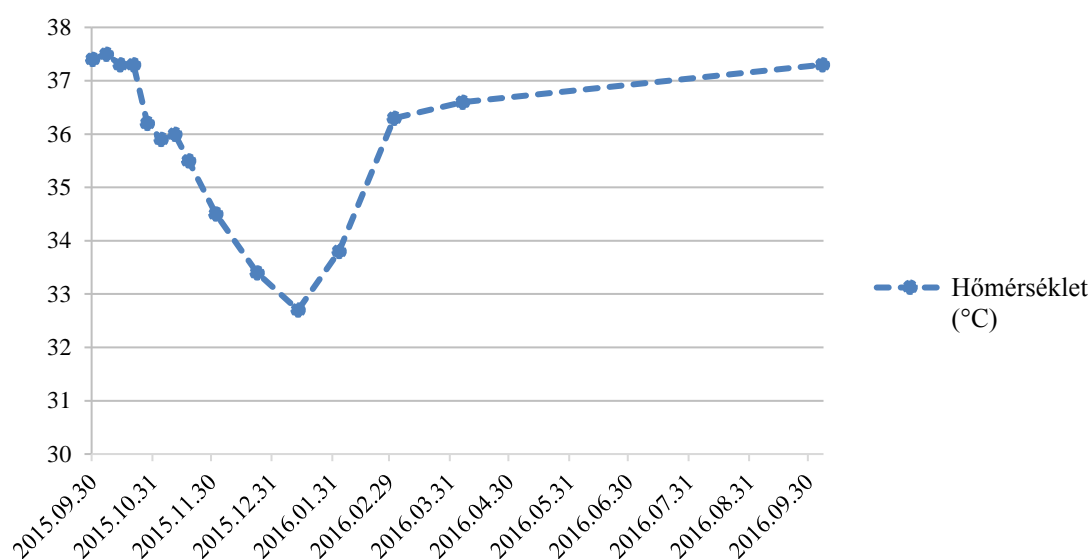
	MJC	MJM	MJW
pH	6,96	6,64	6,71
m-lúgosság (mval/L)	6,2	6,7	6,0
zavarosság (NTU)	0,97	0,99	0
TOC (mg/L)	<2	<2	<2
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	<0,01	0,44	<0,01
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	0,004	0,006	0,004
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	2,1	5,58	1,66
KOI (O ₂ mg/L)	<5	<5	<5
Cl ⁻ (mg/L)	36	44	59
Fe (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01
Fajl. elektr. vezkép (μS/cm) 20°C	730	852	879
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	144	158	140
Keménység (nK°)	24,1	23,5	24,6
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	0,08	<0,01	<0,01

3. táblázat. A BTK déli megcsapolódási rendszeréhez tartozó Diana-Hygieia-forrásbarlangot kitöltő víz főbb fizikai és kémiai paraméterei a 2015-es mintavétel során

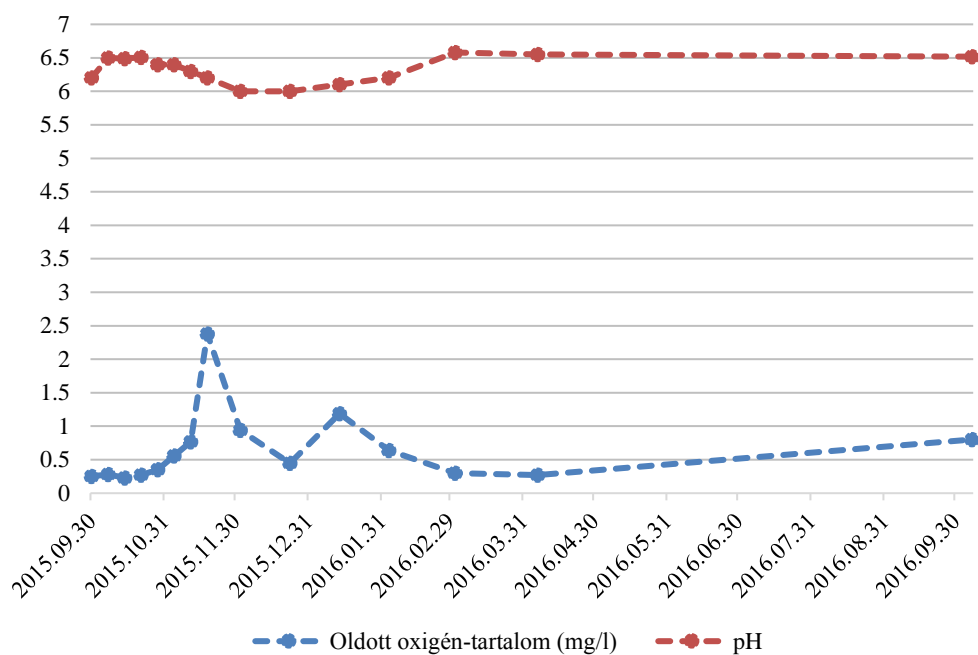
	Diana-Hygieia-forrásbarlang
Víz hőmérséklet (°C)	31,6
pH	6,69
m-lúgosság (mval/L)	6,0
zavarosság (NTU)	1
IC (mg/L)	72
TOC (mg/L)	<0,5
TN (mg/L)	0,3
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	<0,01
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	<0,01
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	1,3
KOI (O ₂ mg/L)	4
Cl ⁻ (mg/L)	156
Fe (mg/L)	<0,01
Fajl. elektr. vezkép (μS/cm) 20°C	1767
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	167
Keménység (nK°)	36,4
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	<0,01

4. táblázat. A BTK déli megcsapolódási rendszeréhez tartozó Rudas-Török-forrásbarlangot kitöltő víz főbb fizikai és kémiai paraméterei a 2014-es mintavétel során

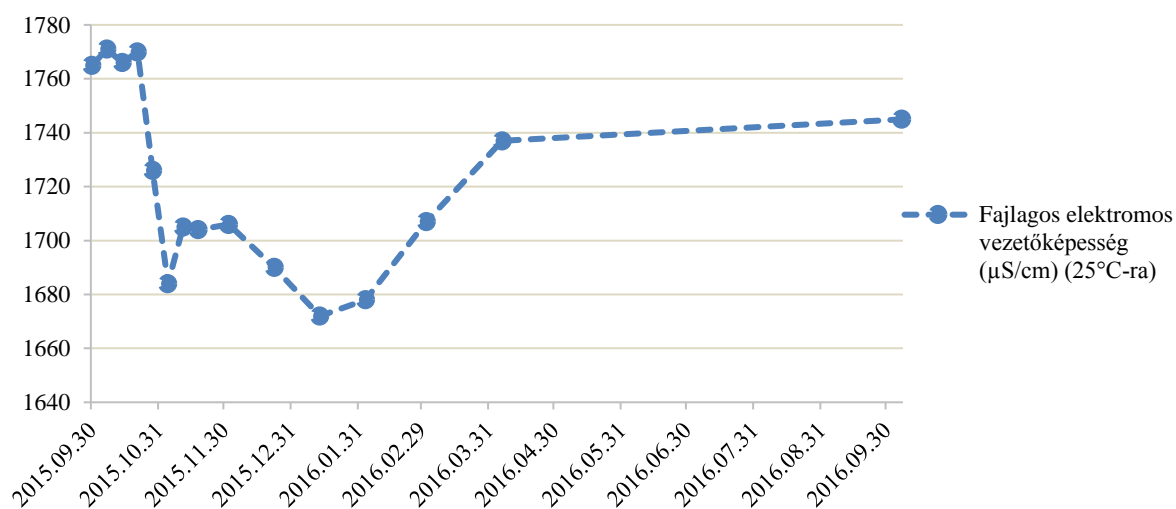
Rudas-Török-forrásbarlang	
Víz hőmérséklet (°C)	37,7
pH	6,65
m-lúgosság (mval/L)	6,0
zavarosság (NTU)	1,09
TOC (mg/L)	3
NH ₄ ⁺ -N (mg/L)	0,19
NO ₂ ⁻ -N (mg/L)	<0,01
NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	<1
KOI (O ₂ mg/L)	2
Cl ⁻ (mg/L)	107
Fe (mg/L)	<0,01
Fajl. elektr. vezkép (μS/cm) 20°C	1508
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	171
Keménység (nK°)	33,6
PO ₄ ³⁻ (mg/L)	<0,01



2. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlang vizének hőmérséklet változása az *in situ* kísérlet folyamán



3. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlang vizének pH és oldott oxigén tartalom változása az *in situ* kísérlet folyamán



4. ábra. A Rudas-Török-forrásbarlang vizének vezetőképesség változása az *in situ* kísérlet folyamán

13. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet mondok:

Dr. Borsodi Andreának, témavezetőmnek, azért a rengeteg munkáért, amit rám áldozott. Köszönöm a sok értékes szakmai tanácsot és iránymutatást, melyek nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre;

Dr. Makk Juditnak, témavezetőmnek szakmai támogatásáért, tanácsaiért, észrevételeiért;

Dr. Márialigeti Károlynak, az ELTE Biológiai Intézet Mikrobiológiai Tanszék egykori vezetőjének, hogy lehetővé tette munkám elvégzését az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén;

Dr. Mádl-Szőnyi Juditnak a geológiai, hidrológiai együttműködést. Hiába tornyosultak előtte feladatai, bármikor készen állt a közös gondolkodásra, a problémák megoldására;

Bodor Petrának, a hidrogeológiában való elmélyülésem segítéséért, a közös munkáért;

Balázs Gergelynek, aki bűvárként segített a mintavételekben;

Dr. Ács Évának és **Dr. Havancsák Károlynak**, hogy az elektronmikroszkópos felvételek elkészülhettek laboratóriumukban;

Dr. Krett Gergőnek, **Dr. Nagymáté Zsuzsának** és **Mentes Anikónak** a segítőkészséget, a vidám pillanatokat;

Dr. Jurecska Laurának, a kémiai paraméterekért és szakmai tanácsokért;

Pál Sárának és **Enyedi Nórának**, akik szakdolgozóként segítették a munkámat;

A **Mikrobiológiai Tanszék valamennyi munkatársának**, akik készséges segítségére mindig számíthattam;

Dr. Török Jánosnak, a Zootaxonómia, Állatökológia, Hidrobiológia Doktori Program vezetőjének;

Szabó Attilának, hogy együtt örült velem a sikereknek, lelki támogatást nyújtott a sikertelenségekkor. Mindvégig mellettem állva, kezdetektől hitt bennem és abban, hogy érdemes ezzel a témával foglalkoznom.

Végül, de nem utolsó sorban **szüleimnek**, **testvéremnek** az önzetlen támogatást és a végtelen türelmet.

A kutatást a hidrogeológusokkal szoros együttműködésben az OTKA (NK101356) pályázat anyagi támogatásával folytattam.

ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Anda Dóra**

MTMT-azonosító: 10053140

A doktori értekezés címe és alcíme: **A Budai Termálkarszt víz és biofilm prokarióta közösségeinek sokfélesége összefüggésben a hipogén karsztosodással**

DOI-azonosító⁴⁶: 10.15476/ELTE.2019.072

A doktori iskola neve: Biológia Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Zootaxonómia, állatökológia, hidrobiológia

A témavezetők neve és tudományos fokozata: Borsodi Andrea PhD; Makk Judit PhD

A témavezetők munkahelye: ELTE TTK Biológiai Intézet Mikrobiológiai Tanszék

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

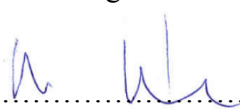
2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2019. április 8.


.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet